

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION " PHARMACIE "

PAR

Jean BORDERIE

PHARMACIEN

PRÉPARATEUR DE TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE BIOLOGIQUE

DIPLOMÉ D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE CHIMIE BIOLOGIQUE

DIPLOMÉ D'OPTIQUE SCIENTIFIQUE ET APPLIQUÉE

né le 17 Décembre 1930, à DREUX (Eure-et-Loir)

Contribution à l'Etude du Dosage des Alcaloïdes dans les Loganiacées et les Solanacées

Utilisation de la Méthode Chromatographique

Soutenue le 23 Octobre 1953, devant la Commission d'EXAMEN

Président	M. MEUNIER
Juges	M. STEIMETZ
	M ^{lle} BESSON

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION " PHARMACIE "

PAR

Jean BORDERIE

PHARMACIEN

PRÉPARATEUR DE TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE BIOLOGIQUE

DIPLOMÉ D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE CHIMIE BIOLOGIQUE

DIPLOMÉ D'OPTIQUE SCIENTIFIQUE ET APPLIQUÉE

né le 17 Décembre 1930, à DREUX (Eure-et-Loir)

Contribution à l'Etude du Dosage des Alcaloïdes dans les Loganiacées et les Solanacées

Utilisation de la Méthode Chromatographique

Soutenue le 23 Octobre 1953, devant la Commission d'EXAMEN

Président	M. MEUNIER
Juges	M. STEIMETZ
	M ^{lle} BESSON



UNIVERSITE DE NANCY

-:-:-:-:- FACULTE DE PHARMACIE

PERSONNEL ENSEIGNANT

DOYEN

Professeur G. RICHARD

ASSESSEUR

Professeur A. MEUNIER

PROFESSEURS

	N	Toxicologie et analyse chimique
M.	MEUNIER A.	Pharmacie Galénique
Mlle	FRANCOIS M. Th.	Matière Médicale
MM.	KAYSER F.	Chimie
	RICHARD G.	Pharmacie Chimique
	FRANQUET R.	Botanique
	MARCHAL J.G.	Microbiologie
	STEIMETZ E.	Sciences Naturelles

MAITRE DE CONFERENCES

MM.	BLOCH J.M.	Sciences Physiques
	SOLEIL J.	Sciences Physiques

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

M.	MEUNIER A.	Hydrologie
Mlle	FRANCOIS M. Th.	Hygiène
MM.	KAYSER F.	Pharmacodynamie
	RICHARD G.	Chimie organique
	FRANQUET R.	Cryptogamie
	MARCHAL J.G.	Parasitologie
	ROBLOT R. Professeur	Déontologie
	Fac. de Droit	
	STEIMETZ E.	Mycologie - Minéralogie
	N	Chimie analytique
	BERNANOSE A.	Physique

CHEFS DE TRAVAUX

Mme	IASSEUR A.	Microbiologie - Parasitologie
Mlle	BESSON S.	Chimie Biologique
MM.	ANZIANI	Chimie
	MANGENOT F.	Micrographie
	MIRJOLET M.	Sciences Pharmaceutiques
	BERNANOSE A.	Physique

CHARGE DE TRAVAUX

M.	PIERFITTE M.	Physique
----	--------------	----------

PROFESSEUR HONORAIRE

M.	CORDEBARD H.
----	--------------

MAITRE DE CONFERENCES HONORAIRE

M.	VERNIER
----	---------

SECRETAIRE

M.	RADUREAU P.
----	-------------

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.

A M O N P E R E et A M A M E R E

Ce faible gage de ma reconnaissance
et de mon affection

A M A F A M I L L E

En témoignage d'affection

A notre Président de Thèse ,

Monsieur le Professeur M E U N I E R
Professeur de Pharmacie Galénique

A nos Juges :

Monsieur le Professeur S T E I M E T Z
Professeur de Sciences Naturelles

Mademoiselle B E S S O N
Chef de Travaux Pratiques de Chimie Biologique

En témoignage de notre grande
reconnaissance.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555804_0006

A Monsieur le Professeur RICHARD
Doyen de la Faculté de Pharmacie,

A Monsieur le Professeur KAYSER
Doyen Honoraire,

A tous nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie de
Nancy et à nos anciens Professeurs de l'Ecole
de Médecine et de Pharmacie de Reims,

A notre ancien Maître de Stage,

l'assurance de toute notre gratitude.

A tous nos Amis.

A V A N T - P R O P O S

Le désir de soutenir une thèse me poursuivait depuis les premiers jours de mes études pharmaceutiques, car elle en représentait pour moi la consécration solennelle.

J'ai pu affecter une année supplémentaire à la réalisation de cette idée grâce à ma présence à Nancy pour le certificat d'études supérieures de Chimie Biologique.

Je voudrais dire ici à mon Maître, Monsieur le Doyen KAYSER, tout ce que je lui dois pour l'enseignement de la Chimie Biologique qu'il m'a prodigué pendant deux ans, et dont le souvenir vivant m'accompagnera tout au long de ma carrière.

Monsieur le Professeur MEUNIER a bien voulu me confier un sujet de travail qui intéresse les sciences pharmaceutiques dans leur essence même, puisque la Pharmacie Galénique représente l'héritage et la tradition des Maîtres apothicaires. Mes recherches montrent que cette partie de la Pharmacie reste bien vivante, et offre toujours un champ d'investigations illimité.

Ma gratitude va tout d'abord à mon Maître et Président de thèse, Monsieur le Professeur MEUNIER, qui ne m'a pas ménagé ses conseils et m'a fait bénéficier de sa grande expérience dans ce domaine.

Mademoiselle BESSON m'a offert l'hospitalité dans son laboratoire. Elle a pris un intérêt quotidien à mes travaux, me guidant avec la plus grande vigilance, m'inculquant d'excellentes disciplines de travail et me consacrant un temps précieux. Je tiens à l'assurer de ma grande reconnaissance et de ma très dévouée affection.

Je remercie également Monsieur le Professeur STEIMETZ pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de juger mon travail.

Je n'aurais garde d'oublier Monsieur le Professeur BLOCH, pour les conseils qu'il m'a donnés, Monsieur BERNANOSSE et Monsieur MIRJOLET, pour les renseignements qu'ils m'ont fournis et Monsieur le Docteur MASIUS pour l'abondante documentation qu'il a mise à ma disposition.

Que la Coopérative de Melun, en la personne de son Directeur régional, Monsieur FREDERIC, et les établissements GIFFER et BARBEZAT, en la personne de Monsieur PORTE, veuillent bien trouver ici l'assurance de ma gratitude pour l'amabilité avec laquelle elles m'ont gracieusement fourni des préparations galéniques titrées.

La préparation d'une forme pharmaceutique ne présente en général pas de difficultés lorsqu'elle est décrite dans les formulaires. Toutefois, le degré de son activité peut être très variable, soit que la matière première utilisée n'ait pas eu la richesse en principes actifs nécessaires, soit que ces principes aient été altérés au cours de l'obtention du médicament ou durant sa conservation. Le contrôle de la valeur de certaines préparations s'impose donc au pharmacien.

Cette obligation a suscité d'innombrables recherches pour établir les méthodes de dosage convenable. Les pharmacopées de tous les pays ont chacune porté leur choix sur les procédés qui leur paraissaient les meilleurs, mais la diversité même de ces techniques prouve qu'elles sont loin de donner entière satisfaction.

Chaque jour, de nouvelles méthodes s'élaborent, améliorant les procédés existants ou en créant de nouveaux, essayant ainsi peu à peu d'atteindre l'exactitude que requiert un dosage dont dépendra la sécurité d'une prescription.

Dans ce travail, nous avons essayé d'apporter une contribution à ces problèmes analytiques. L'utilisation si féconde de la chromatographie dans toutes les sciences, et en particulier dans le domaine pharmaceutique, nous a naturellement incité à employer ce procédé dans notre étude.

L'analyse des préparations galéniques de loganiacées et de solanacées a toujours présenté des difficultés, non seulement d'exécution, mais aussi d'interprétation, en raison de la présence de plusieurs alcaloïdes dans ces drogues. C'est pourquoi nous avons, sur les conseils de M. le Professeur MEUNIER, fait porter nos recherches sur ces préparations, notre but étant de trouver un procédé simple et rapide de contrôle de leur titre alcaloïdique.

Nous avons profité de cette étude pour rassembler, à titre documentaire, les procédés actuels de dosage signalés par quelques pharmacopées étrangères. Bien que ce groupement n'ait pas la prétention d'être complet, nous espérons néanmoins qu'il permettra aux chercheurs de se renseigner sur les plus récentes méthodes ayant trait au dosage des alcaloïdes des loganiacées et des solanacées.

Après quelques données générales relatives à la chromatographie sur colonne appliquée à l'analyse pharmaceutique, nous rappelons rapidement la composition chimique des drogues étudiées, les préparations galéniques inscrites à la pharmacopée française de 1949, et nous décrivons les principales méthodes officielles utilisées actuellement pour leur dosage.

Dans un deuxième chapitre nous étudions les méthodes non officielles, en considérant successivement l'extraction et la purification des alcaloïdes (en insistant sur les procédés chromatographiques), la séparation des divers alcaloïdes et enfin leur titration après isolement.

Nous consacrons enfin le troisième chapitre à la méthode que nous avons mise au point pour permettre au pharmacien de contrôler les médicaments utilisés (comme la loi lui en fait une obligation), ceci dans le minimum de temps, par un procédé d'exécution facile, n'exigeant ni appareillage spécial ni prise d'essai importante.

Voici le plan qui sera suivi au cours de notre travail :

Introduction

L'utilisation de la chromatographie sur colonne dans l'analyse des médicaments.

Première partie : LOGANIACEES =====

Chapitre I : Loganiacées officinales - Méthodes officielles de dosage

A - Loganiacées inscrites au Codex 1949

- a) Composition chimique
- b) Brucine et strychnine

B - Préparations officinales

- a) Noix vomique
- b) Fèves de St Ignace

C - Procédés de dosage des pharmacopées française et étrangères

- a) Pharmacopée française
- b) Pharmacopées étrangères
- c) Comparaison rapide entre les différentes pharmacopées

Chapitre II : Méthodes non officielles de dosage

A - Extraction et purification des alcaloïdes

- a) Méthodes voisines de celle du Codex
- b) Emploi de l'alumine
- c) Emploi des résines échangeuses d'ions

B - Procédés de séparation strychnine-brucine

- a) Par précipitation sélective
- b) Par différence de comportement chromatographique
- c) Par destruction de la brucine
- d) Par spectrophotométrie

C - Titration des alcaloïdes

- a) Par volumétrie
- b) Par gravimétrie
- c) Par colorimétrie
- d) Par polarographie et potentiométrie
- e) Par essai biologique

Chapitre III : Travaux personnels

A - Extraction et purification des alcaloïdes

- a) Choix du procédé
- b) Essais préliminaires
- c) Application aux préparations de noix vomique
- d) Application aux préparations de fèves de St Ignace

B - Séparation strychnine-brucine

- a) Essais préliminaires
- b) Procédé utilisé et applications aux préparations de noix vomique
- c) Application aux préparations de fèves de St Ignace

C - Titration finale des alcaloïdes

D - Conclusions

Deuxième partie : SOLANACEES

=====

Chapitre I : Solanacées officinales - Méthodes officielles de dosage

A - Solanacées mydriatiques inscrites au Codex 1949

- a) Composition chimique
- b) Hyoscyamine et atropine. Racémisation
- c) "Alcaloïdes" volatils

B - Préparations officinales

- a) Belladone
- b) Datura
- c) Jusquiame

C - Procédés de dosage des pharmacopées française et étrangères

- a) Pharmacopée française
- b) Pharmacopées étrangères
- c) Comparaison rapide entre les différentes pharmacopées

Chapitre II : Méthodes non officielles de dosage

A - Extraction et purification des alcaloïdes

- a) Méthodes voisines de celle du Codex
- b) Emploi de l'alumine
- c) Emploi d'autres adsorbants

- d) Emploi des résines échangeuses d'ions
- e) Autres méthodes

B - Procédés de séparations hyoscyamine-scopolamine

C - Titration des alcaloïdes

- a) Par volumétrie
- b) Par colorimétrie
- c) Procédés physicochimiques
- d) Par essai biologique

D - Conclusions

Chapitre III : Travaux personnels

A - Extraction et purification des alcaloïdes

- a) Essais préliminaires
- b) Procédé utilisé
- c) Application aux préparations de belladone
- d) Application aux préparations de datura
- e) Application aux préparations de jusquiame

B - Elimination des bases volatiles

C - Titration des alcaloïdes

D - Conclusions

Résumé et conclusions
=====

I N T R O D U C T I O N

-:-:-

L'UTILISATION DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE
DANS L'ANALYSE DES MEDICAMENTS A BASE D'ALCALOIDES

-:-:-

Depuis 1906, date à laquelle le botaniste M.TSWETT décrivait, dans son ouvrage sur les chlorophylles dans le monde végétal et animal, une méthode originale de séparation des pigments, la chromatographie, grâce à de nombreux travaux s'est assurée une place de plus en plus importante dans tous les domaines.

Nous citerons seulement quelques noms marquant chacun une étape importante dans l'essor de ce procédé (+). En 1931, KUHN et LEDERER montrent que la méthode de TSWETT peut servir à d'autres séparations que celle des pigments et, dès lors, la méthode connaît un immense succès. En 1938, REICHSTEIN introduit le "chromatogramme liquide" permettant des séparations de substances incolores. En 1940, TISELIUS met au point ses méthodes "d'analyse frontale" et de "développement par déplacement" pour l'étude des protéines. En 1941, MARTIN et SYNGE introduisent la chromatographie de partage sur gel de silice, qui permet d'analyser les acides aminés neutres avec quelques milligrammes seulement de protéines. (Ces deux auteurs ont obtenu, en 1952, le prix Nobel pour leurs travaux sur la chromatographie). En 1944, CONSDEN, GORDON et MARTIN inventent la chromatographie de partage sur papier, méthode très ingénieuse, permettant d'analyser non plus quelques milligrammes, mais quelques gammas de produits.

(+) On trouvera dans l'ouvrage de E.LEDERER (95) une étude très complète de l'analyse chromatographique. On pourra aussi consulter avec profit l'article de W.PARTRIDGE (112)

Depuis quelques années, enfin, la chromatographie s'enrichit de nouvelles possibilités d'application par la substitution aux adsorbants habituellement employés des résines échangeuses d'ions.

° °

Rappelons le principe de la chromatographie : On filtre une solution plus ou moins complexe sur une colonne de poudre adsorbante, qui est souvent l'alumine. Certains constituants sont retenus (adsorbés). Le lavage de la colonne (ou élution) avec des solvants convenablement choisis permet de retrouver les uns après les autres dans le filtrat (ou éluat) certains de ces constituants.

La méthode permet donc de réaliser :

- 1°) une purification en retenant des substances gênantes et inutiles,
- 2°) un isolement de produits voisins en les libérant par des solvants différents.

Voici, en quelques mots, la théorie de l'adsorption des alcaloïdes :

En 1952, H. BÖHME et H. LAMPE (20) ont cherché à expliquer le mode d'action de l'alumine sur les sels d'alcaloïdes. Leurs expériences montrent qu'il s'agit d'un échange d'ions.

D'après l'équation



et l'équilibre



une solution de chlorhydrate d'alcaloïde contient en plus de l'alcaloïde et les ions (Cl), la base libre et des ions hydroxonium. Si l'alumine contient des ions (Na) échangeables, comme c'est le cas avec les "aluminos alcalines", l'ion Na est déplacé par l'ion hydroxonium, l'équilibre est complètement déplacé à droite, la base est rendue libre et le filtrat contient des quantités équivalentes de Na et les ions Cl.

En solution alcoolique, l'équilibre est aussi déplacé vers la droite, et les chlorhydrates, même de bases assez fortes



En 1949, D. VAN OS (141), étudiant la pharmacopée anglaise de 1948, propose de remplacer l'extraction des alcaloïdes à l'aide d'un solvant, (méthode inattaquable du point de vue scientifique, mais longue et compliquée) par la chromatographie à condition de posséder une alumine convenable. Le procédé de REIMERS, GOTTLIEB et CHRISTENSEN, dit-il, "donne de très bons résultats et exige moins de temps et de matériel que la méthode d'extraction par un solvant". Mais une condition est nécessaire pour obtenir ces bons résultats : Il faut une alumine complètement libre de tout alcali, et douée d'un bon pouvoir d'adsorption.

F. REIMERS, K.R. GOTTLIEB et V. La CHRISTENSEN insistaient sur plusieurs points, et surtout sur la qualité de l'alumine. Il est indispensable d'employer "l'alumine MERCK, anhydre très pure" (qualité à peu près introuvable en France actuellement). Or, la reproductibilité des résultats dépend essentiellement de la capacité d'adsorption et de l'alcalinité de l'alumine utilisée.

Les auteurs furent donc obligés de proposer deux tests de contrôle pour l'alumine utilisée: un test d'adsorption avec le chlorhydrate de procaine et un test d'alcalinité en faisant un essai à blanc.

Les qualités de l'alumine étant primordiales, il nous paraît utile d'indiquer les tests auxquels doit répondre une alumine de haute activité (D.VAN OS - 142)

NEUTRALITE : 1g d'alumine agitée avec 20 cm³ d'eau, doit donner un filtrat neutre au papier de tournesol.

ADSORPTION : Dans un erlen, on ajoute à 5 g d'alumine 20 cm³ d'une solution à 1% de chlorhydrate de procaine dans l'alcool. Après un contact de 15 minutes en agitant le flacon, on filtre à travers un filtre de 11 cm de diamètre. A 10 cm³ du filtrat on ajoute 10 cm³ d'eau, 5 gttes de solution de bleu de bromothymol et on titre jusqu'à coloration verte avec HCl 0,1 N. On doit en utiliser 1,20 à 2,40 cm³.

VOLUME : Introduire 10 g d'alumine dans le tube à chromatographie (diamètre intérieur 10 mm): tenir le tube verticalement sur une surface rigide et faire tomber l'alumine en 10 fois d'une hauteur de 1 cm. La hauteur de la colonne dans le tube doit être alors de 12,5 à 14,5 cm.

Fixer le tube sur le flacon à succion et faire passer 10 cm³ d'alcool à 90°, sous 390 à 410 mm de mercure, à travers la colonne. Le temps doit être de 2,5 min. à 5 min. On fait alors passer de la même façon 30 cm³ d'alcool à 90°. Le filtrat est utilisé pour les essais suivants :

ALCALINETE : à 10 cm³ de filtrat ajouter 10 cm³ d'eau et 5 gttes de solution de bleu de bromophénol. Il doit apparaître une coloration jaune ou verte.

SUBSTANCES SOLUBLES : Evaporer 10 cm³ du filtrat à sec. Sécher à 100° à poids constant. Le poids de résidu ne doit pas excéder 2 mg.

Ces essais sont indispensables avant d'entreprendre un dosage par la méthode de REIMERS, GOTTLIEB et CHRISTENSEN, et ils avaient déjà été indiqués par ces auteurs.

En 1950, B.G. KELLET et D.L.T. CADMAN (85) reprennent ces travaux et signalent que l'alumine peut être "avantageusement remplacée" par un alcali doux insoluble dans l'alcool à 90°, tel que le carbonate de sodium anhydre, le bicarbonate de sodium ou le borate fondu et pulvérisé.

On ne peut plus parler ici d'adsorption. Il ne s'agit plus que d'une "neutralisation" et les résultats sont parfois surélevés par entraînement alcoolique de faibles quantités de l'alcali.

En 1947, MAIER (99) a substitué à l'alumine tout simplement du coton qui s'est révélé d'un emploi facile pour le dosage des alcaloïdes dans les extraits secs de la pharmacopée helvétique.

Il importe donc d'avoir à sa disposition des alumines d'une haute activité vis-à-vis des substances gênantes, mais ne retenant pas les alcaloïdes et ne cédant pas l'alcali libre au solvant utilisé pour l'élution.

Si le dosage chromatographique des alcaloïdes dans les préparations galéniques, tel qu'il fut décrit pour la première fois par MERZ et FRANCK (104) n'a pas connu alors le succès attendu, c'est précisément en raison de la qualité de l'alumine exigée. Il s'agissait pourtant d'un procédé simple qui aurait dû, à côté de procédés peu connus, longs et coûteux, agir comme une méthode révolutionnaire.

Actuellement encore, la nécessité d'alumines standardisées restreint la diffusion de la plupart des méthodes chromatographiques appliquées aux alcaloïdes. En effet, il est assez difficile de se procurer en France (du moins pour des laboratoires non spécialisés) les deux alumines les plus couramment employées à l'étranger : l'alumine MERCK anh.puriss. et l'alumine MERCK standardisée suivant BROCKMANN.

Aussi la méthode que GRAF (65) a utilisée pour tous les alcaloïdes (et sur laquelle nous aurons l'occasion de revenir puisqu'elle a inspiré nos travaux) présente un grand intérêt : en effet, ici, la qualité de l'adsorbant ne joue pas, de sorte que même une alumine technique du commerce peut convenir. Nous signalons cependant une exception, la séparation brucine-strychnine, qui exige l'emploi d'alumine possédant une activité connue telle que l'alumine standardisée suivant BROCKMANN.

°
° °

En 1935 ADAMS et HOLMES (1) préparent des résines synthétiques, homologues organiques des composés minéraux naturels employés déjà dans l'industrie sous le nom de permutites; elles possèdent la propriété d'échanger avec le milieu où elles se trouvent, des anions et des cations. En 1939, GRIESBACH (66) étudia en détail la préparation, la composition, le mode d'action et la capacité d'échange de ces résines.

En 1949, A. JINDRA (80) a publié un important travail sur la détermination des alcaloïdes par les échangeurs d'ions. Il y étudie d'une part les conditions convenables pour le dosage des alcaloïdes, et d'autre part, l'application du procédé aux produits galéniques - qui ne lui donne d'ailleurs pas toute satisfaction.

L'auteur emploie l'Amberlite IR - 4B de la "Resinious Products and Chemical Company of Philadelphia - U.S.A." qu'il est assez difficile de se procurer actuellement en France. On utilise une colonne de 0,5 cm de diamètre sur 5 cm de hauteur. La colonne doit être régénérée avant et après chaque analyse

par 50 cm³ d'une solution de carbonate de sodium à 4 pour cent, dont l'excès est enlevé par de l'eau bouillante. La condition de succès de la méthode réside dans l'emploi d'un solvant où le sel d'alcaloïde et l'alcaloïde base soient facilement solubles. Le débit à peu d'importance, 90 à 120 gouttes par minute en général, 30 à 40 gouttes seulement pour l'atropine.

Le dosage final se fait par acidimétrie directe, sauf lorsqu'on se trouve en présence de solutions de produits galéniques colorés. Il faut alors fixer le terme du dosage électro-nétriement (81) La durée totale de l'analyse est de 1 heure et demi environ.

En 1952, H. BAGGESGAARD, D. FUCHS et L. LUNDBERG (10) au cours d'une étude sur le mode d'action des échangeurs d'ions, indiquent que l'Amberlite IR.A-400 est préférable à IR-4B pour le dosage des sels d'alcaloïdes.

F.O. GUNDERSEN, R. HEIZ et R. KLEVSTRAND (68) ont proposé en Septembre 1953 l'utilisation du DOWEX 2 qui conviendrait particulièrement bien aux sels de strychnine. Il exige moins de temps que l'Amberlite IR.A-400 pour sa régénération.

P R E M I E R E P A R T I E

L O G A N I A C E E S

-:-:-:-

C H A P I T R E I

-:-:-

LOGANIACEES OFFICINALES

METHODES OFFICIELLES DE DOSAGE

Nous étudierons successivement les loganiacées et leurs préparations utilisées dans la pharmacopée française, et, après avoir noté les alcaloïdes actifs, nous verrons les procédés de dosage retenus par les différentes pharmacopées.

+++++

+++++ LOGANIACEES INSCRITES AU CODEX 1949

+++++

La principale loganiacée est la noix vomique - Strychnos Nux Vomica - dont la partie employée est la senéce.

Les senéces broyées sans résidu forment la poudre de noix vomique, dont la teneur en alcaloïdes totaux et en strychnine doit être contrôlée. Cette poudre sert à préparer un extrait sec qui est à son tour utilisé pour obtenir la teinture de noix vomique.

La fève de Saint Ignace figure également à la pharmacopée. Elle est fournie par une plante voisine, Strychnos Ignatii Berg., dont la graine sert à préparer, outre la poudre, la teinture de fève de St Ignace composée, ou gouttes amères de Bauné.

++++

+++++ COMPOSITION CHIMIQUE

++++

Le contenu cellulaire de la noix vomique renferme une huile, un hétéroside - le loganoside - et plusieurs alcaloïdes. L'huile, de saveur désagréable, serait gênante pour les préparations galéniques, aussi est-elle enlevée par l'éther dans la préparation de l'extrait.

Parmi les alcaloïdes, les uns sont en proportion insignifiante, tels que les colubrines, la vomicine, la struzine, les deux bases isolées par WIELAND en 1940 et un isomère de la strychnine, l'isostrychnine de formule $C_{21}H_{22}N_2O_2$, isolée par LEUCHS et SCHULTE en 1943. Les principes actifs sont surtout représentés par la strychnine et la brucine, unies à l'acide igasurique ou acide chlorogénique. Ces deux alcaloïdes présentent entre eux des relations étroites, mais malgré les travaux de TAFEL, LEUCHS, WIELAND et ceux de PERKIN et ROBINSON de 1910 à 1934, la constitution de ces deux bases n'est pas encore élucidée.

La strychnine, découverte en 1818 par PELLETIER et CAVENTOU a pour formule brute $C_{21}H_{22}N_2O_2$ et possède en solution dans l'eau faiblement acide un pouvoir rotatoire lévogyre. La brucine, qui a pour formule brute $C_{23}H_{26}N_2O_4 + 4 OH_2$, serait une diméthoxy-strychnine.

++++
++++ BRUCINE ET STRYCHNINE

Ces deux alcaloïdes, les seuls vraiment importants des loganiacées inscrites au Codex, et aussi les seuls bien étudiés, sont voisins mais non identiques. La strychnine est, nous le verrons, beaucoup plus toxique que la brucine, les réactions colorées ou de précipitation ne sont pas les mêmes, la séparation semble assez facile.

Le vomiquier renferme en moyenne 1 à 2 pour cent de strychnine pour 0,7 à 1,5 pour cent de brucine dans la semence, tandis que la fève de St Ignace contient 1,5 pour cent de strychnine et 0,5 pour cent seulement de brucine. La falsification de la noix vomique par la fève de St Ignace serait donc dangereuse, car pour un même poids d'alcaloïdes totaux, elle renferme environ 75 pour cent de strychnine, alors que la noix vomique n'en compte que 50 pour cent.

Or la toxicité d'une préparation de loganiacée dépend surtout de la quantité de strychnine, ainsi que l'ont montré les

expériences de L.LACHAISE (92) sur des poissons, des cobayes et des chiens. Les résultats obtenus lui permettent d'écrire :

"Le dosage de la strychnine seule a un très grand avantage sur les autres méthodes. Il concorde avec le dosage physiologique, et par conséquent rend celui-ci superflu pour l'évaluation de l'activité des préparations des strychnées. Les résultats du dosage chimique et du dosage physiologique sont en effet parallèles. La toxicité d'une préparation de strychnée est surtout facteur de la quantité de strychnine, la brucine n'augmentant que très légèrement la toxicité de cette préparation".

+++++

+++++ PREPARATIONS OFFICINALES

+++++

Les préparations officinales ne sont pas très nombreuses. Elles présentent quelques particularités dans leur mode d'obtention et doivent contenir un taux fixe d'alcaloïdes. Nous les étudierons assez rapidement en mentionnant le taux.

++++

++++

NOIX VOMIQUE

I - POUDRE DE NOIX VOMIQUE : On l'obtient par pulvérisation sans résidu des graines, mais celles-ci étant presque uniquement constituées par un albumen corné très dur, aux membranes très résistantes, il faut les ramollir par exposition à la vapeur d'eau bouillante, puis les couper en tranches minces avant de les broyer dans un moulin en acier.

Le Codex 1949 prescrit le dosage des alcaloïdes totaux et celui de la strychnine seule. Le résultat est rapporté à la poudre séchée à 100°. "La noix vomique officinale doit contenir de 2 à 3 pour cent d'alcaloïdes totaux, dont 45 pour cent au moins à l'état de strychnine". Cette phrase appelle quelques remarques qui nous semblent importantes.

Signalons tout d'abord la marge qui est laissée pour les alcaloïdes totaux. Une poudre qui titre 3 pour cent contient 50 pour cent d'alcaloïdes de plus qu'une poudre titrant 2 pour cent; or, elles sont toutes deux officinales. On administre généralement la poudre par petites doses, 0,02 g à 0,05 g par

dose. Prenons le chiffre de 0,05 g: pour une poudre titrant 2 pour cent d'alcaloïdes totaux, il correspond à 1 mg d'alcaloïdes, alors que pour une poudre à 3 pour cent nous aurions 1,5 mg: la différence est très appréciable.

D'autre part, le Codex mentionne: au moins 45 pour cent de strychnine. Il en résulte que des poudres contenant plus de strychnine peuvent être utilisées. Si la moyenne en strychnine est admise osciller autour de 45 pour cent, les travaux de L. LACHAISE (92) montrent par contre que certaines poudres en contiennent beaucoup plus. Sur 5 poudres étudiées, cet auteur trouve 34,7 - 38,7 - 47,9 - 54,45 et 59,9 pour cent de strychnine. Les trois dernières poudres sont officinales, et pour une prise d'essai de 0,05 g, la quantité minimum de strychnine peut être 0,45 mg (45 pour cent de strychnine dans 2 pour cent d'alcaloïdes totaux), mais aussi 0,90 mg dans le cas d'une poudre à 59,9 pour cent en strychnine et 3 pour cent d'alcaloïdes totaux, résultat qui va cette fois du simple au double ! Ce sont là évidemment des chiffres extrêmes, et les quantités de strychnine sont bien inférieures dans les deux cas aux doses maximum, mais les effets thérapeutiques seront quand même moitié plus faibles avec la première poudre qu'avec la seconde.

Al. GORIS, A. LIOT et M.M. JANOT, An. GORIS (64) admettent que la moyenne serait de 2,75 à 3,50 pour cent en alcaloïdes totaux, les chiffres trouvés par L. LACHAISE (92) oscillent de 2,11 à 3,32. Le Codex pourrait adopter 2,50 en tolérant, comme il le fait pour l'extrait, 0,10 en plus ou en moins. L. LACHAISE avait proposé 1,25 pour cent en strychnine, pour la poudre, soit 2,50 g environ d'alcaloïdes totaux en considérant que la poudre contient 40 à 50 pour cent de strychnine. Ce chiffre serait en accord avec les principales pharmacopées étrangères. C'est toutefois le dosage de strychnine seule qui nous semble préférable, comme nous le verrons plus loin.

II - EXTRAIT DE NOIX VOMIQUE. C'est un extrait sec et dégraissé: après obtention d'une teinture par lixiviation, celle-ci est concentrée puis traitée par l'éther (qui enlève l'huile gé-

nante)

enfin évaporée à consistance d'extrait sec. Cet extrait doit renfermer 16 pour cent d'alcaloïdes totaux. Le Codex prescrit d'ajuster la préparation à ce titre, mais avec une tolérance de variation de 15,5 à 16,5 pour cent.

Il n'est pas fait mention du taux de strychnine, toutefois, comme la poudre officinale doit renfermer au moins 45 pour cent de strychnine, l'extrait devrait en contenir le même taux.

III - TEINTURE DE NOIX VOMIQUE. Elle est préparée par dilution de l'extrait au moyen d'alcool à 70°, de façon à renfermer 0,25 g d'alcaloïdes totaux pour cent (Convention internationale). Il faut donc 15,62 g d'extrait pour 1.000 g de teinture, ce qui correspond ainsi à une teinture au 1/10 pour une poudre moyenne ayant une teneur de 2,50 d'alcaloïdes totaux pour cent (Le Codex admet 2 à 3 g pour la poudre).

La préparation étant très simple, le titre de la teinture ne devrait pas être éloigné du chiffre théorique. Mais encore faudrait-il que l'extrait utilisé soit au titre convenable: nous verrons que c'est loin d'être toujours le cas et le titrage de la teinture est nécessaire.

++++
++++

FEVES DE SAINT IGNACE

I - POUDRE DE FEVES DE ST IGNACE. La préparation est comparable à celle de la poudre de noix vomique. Le titre, rapporté à la poudre desséchée à 100°, doit être de 2 pour cent environ.

Le Codex est ici assez peu précis, car il ne donne pas de limites à la variation de titre admise. D'autre part, on ne dose pas la strychnine seule. Or dans la fève de St Ignace, cette strychnine représente 55 à 60 pour cent des alcaloïdes totaux. La substitution de la fève de St Ignace à la noix vomique donnerait par suite un produit plus actif et plus toxique.

L. LACHAISE avait trouvé des chiffres allant de 56,8 à 73,5 pour cent en strychnine, donc des écarts importants, et préconisait un dosage de strychnine pure.

II - TEINTURE DE FEVES DE ST IGNACE COMPOSEE . Cet alcoolé, aussi appelé gouttes amères de Baumé, est deux fois plus actif environ que la teinture de noix vomique, puisqu'il doit renfermer de 0,40 à 0,50 pour cent d'alcaloïdes totaux. Le Codex prescrit d'ajuster cette préparation à ce titre.

+++++ PROCÉDES DE DOSAGE DES PHARMACOPEES FRANCAISE
+++++ ET ETRANGERES
+++++

Devant l'activité de la strychnine et la forte proportion de cet alcaloïde dans les préparations de loganiacées, le dosage de ce principe actif est indispensable. Mais, malgré les travaux de L. LACHAISE qui demandait un titre exprimé en strychnine pure, puisque, nous l'avons vu, cet alcaloïde intervient pratiquement seul dans les propriétés de la drogue, le Codex a conservé le titre en alcaloïdes totaux, suscitant ainsi de nombreuses critiques. Il est bien fait mention, pour la poudre de noix vomique d'un dosage de strychnine seule, mais ce dernier dosage n'a peut-être pas grande signification, puisqu'il ne fixe qu'un minimum, ce qui n'empêche pas la fraude par la fève de St Ignace, et permet de grandes variations de titre.

+++++ PHARMACOPEE FRANCAISE
+++++

A la recherche d'une méthode simple et précise, le Codex a adopté successivement un dosage gravimétrique puis volumétrique.

I - CODIX 1908

A)- POUDRE : Les alcaloïdes sont déplacés par une base (ammoniacque diluée) puis extraits par un mélange éther-chloroforme dans la proportion de 20 cm³ de chloroforme pour 100 cm³ d'éther (ces chiffres sont importants à noter, car la strychnine étant théoriquement insoluble dans l'éther, les proportions seront sans cesse modifiées dans le but d'obtenir une meilleure extraction).

On enlève en même temps l'huile, et on purifie les alcaloïdes par épuisement au moyen d'eau acidulée. On les extrait ensuite de leur solution aqueuse, après déplacement par l'ammoniaque, à l'aide d'éther-chloroforme, on évapore la solution, sèche à 100° et pèse.

B)- EXTRAIT : L'extraction se fait par le chloroforme seul après déplacement par l'ammoniaque et le dosage se termine par acidimétrie après purification des alcaloïdes.

II - CODEx 1937

A)- POUDRE : L.LACHAISE avait fait plusieurs remarques sur le dosage par le procédé de 1908 : la quantité de chloroforme était trop faible et risquait d'entraîner toute la brucine mais pas toute la strychnine. D'autre part, le chloroforme restant combiné aux alcaloïdes, même après un très long séjour à l'étuve, il existait des erreurs par excès.

Le Codex 1937 prit ces remarques en considération et modifia en conséquence le procédé indiqué :

Le mélange est plus riche en chloroforme (30 cm³ pour 90 cm³ d'éther) et le dosage final se fait volumétriquement. Au lieu d'être posés, les alcaloïdes obtenus sont dissouts dans un peu d'alcool et titrés par un acide 0,1 N en excès en présence de rouge de méthyle.

Ici intervient toutefois une cause d'erreur, car on prend le poids moléculaire moyen des deux alcaloïdes, en admettant qu'ils se trouvent dans la proportion de 50 pour cent chacun, ce qui est l'exception, ainsi que l'avait montré L. LACHAISE.

Le Codex 1937 introduit le dosage de la strychnine seule par un procédé inspiré de celui de GORDIN et déjà utilisé par la pharmacopée anglaise. Après le dosage des alcaloïdes totaux, on élimine l'alcool, on dissout le résidu dans l'acide sulfurique dilué et on détruit la brucine par oxydation avec l'acide nitrique dilué, 10 minutes exactement à 50 - 60°. Après extraction et purification de la strychnine, on termine par pesée, après passage à l'étuve.

La poudre de fèves de St Ignace se dose exactement comme celle de la noix vomique. Les résultats sont rapportés à la poudre desséchée à 100°.

B)- EXTRAIT : On dose les alcaloïdes totaux comme dans la poudre, après avoir ajouté un peu de pierre ponce à l'extrait. Le Codex ne mentionne pas de dosage de strychnine.

On pourrait admettre qu'un extrait préparé à partir d'une poudre Codex doit renfermer un taux de strychnine suffisant, rien cependant ne le prouve à priori.

En effet, une expérience de L. LACHAISE - reprenant des travaux de B. HEBERT (72) - est tout à fait significative: préparant deux échantillons de gouttes amères de Baumé, l'un suivant le procédé Codex (avec suie et carbonate de potasse) l'autre sans addition de ces substances, il obtient les pourcentages suivants en alcaloïdes :

Alcaloïdes totaux : 4,86 %/° pour le premier échantillon (avec carbonate de potasse et suie) et 4,73 %/° pour le second. La différence est faible, mais le pourcentage de strychnine est 67,6 pour cent pour le premier, et seulement 64,1 pour cent pour le deuxième. La différence dans le chiffre des alcaloïdes totaux semble donc due à une légère perte en strychnine. Nous voyons qu'un simple traitement par l'alcool n'entraîne pas forcément les alcaloïdes dans un rapport constant. Le titre en strychnine de l'extrait peut donc être plus faible que celui de la poudre, et il semble que le dosage de la strychnine serait souhaitable ici aussi.

C)- TEINTURE : Après évaporation et addition de pierre ponce, elle est traitée comme la poudre, en vue d'un dosage d'alcaloïdes totaux.

Les gouttes amères de Baumé se dosent comme la teinture de noix vomique.

III - CODEX 1949

Il n'apporte que peu de modifications aux prescriptions de 1937.

A)- POUDRE : Le dosage des alcaloïdes totaux est identique, mais le dosage de la strychnine se termine volumétriquement. La posée qui introduisait - malgré toutes les précautions - une légère erreur, a donc été supprimée.

Voici la méthode, telle qu'elle est décrite à l'article NOIX VOMIQUE :

"Dosage des alcaloïdes - I° - Alcaloïdes totaux (brucine et strychnine.) - Déterminez la teneur en eau en desséchant 0,50g de cette poudre à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant.

Préparez le mélange éthéro-chloroformique suivant: chloroforme 70 cm³, éther éthylique 210 cm³, qui servira à l'extraction des alcaloïdes.

Introduisez dans un flacon muni d'un bouchon de verre une prise d'essai correspondant à 12 g de poudre desséchée à 100°.

Ajoutez 120 cm³ du mélange éthéro-chloroformique. Bouchez le flacon et agitez pendant cinq minutes; ajoutez 5 cm³ d'un mélange à parties égales d'ammoniaque officinale et d'eau distillée. Maintenez le flacon solidement bouché, laissez 24 heures en contact en agitant de temps en temps. Laissez déposer et filtrez dans un endroit frais, sur un filtre à plis placé dans un entonnoir recouvert d'une plaque de verre. Recueillez 80 cm³ de liqueur éthéro-chloroformique; cette quantité correspond à 8 g de poudre sèche.

Introduisez le liquide filtré dans une ampoule à décantation et agitez successivement avec 25 cm³, 15 cm³ et 10 cm³ d'un mélange de 2 cm³ d'acide chlorhydrique officinal et de 48 cm³ d'eau distillée.

Réunissez les solutions acides dans une deuxième ampoule, ajoutez 50 cm³ du mélange éthéro-chloroformique, puis un léger excès de solution d'ammoniaque à 50 pour cent.

Agitez fortement à plusieurs reprises sans craindre de troubler le mélange.

Après séparation complète des deux couches liquides, soutirez le liquide aqueux ammoniacal dans une nouvelle ampoule, et agitez-le encore à plusieurs reprises avec 30 cm³ du mélange éthéro-chloroformique.

Réunissez les liqueurs éthéro-chloroformiques que vous distillerez avec précaution en deux fois au bain-marie dans une fiole conique de 150 cm³.

Pour le titrage, dissolvez au bain-marie les alcaloïdes dans 5 cm³ d'alcool à 95° neutre, ajoutez 10 cm³ de solution décimale d'acide sulfurique, 10 cm³ d'eau distillée et deux gouttes de solution de rouge de méthyle.

Titrez ce liquide acide à l'aide de solution décimale d'hydroxyde de potassium jusqu'à virage du jaune de la coloration

rouge primitive. Notez le nombre v de cm^3 de solution décimormale d'hydroxyde de potassium employée; $(10 - v)$ représentera le nombre n de cm^3 de solution décimormale d'acide ayant servi à saturer les alcaloïdes.

P.M. moyen de la strychnine et de la brucine = 364

Teneur pour cent en alcaloïdes du produit essayé :

$$n \times 0,0364 \times 100$$

8

2° - Strychnine - Portez au bain-marie bouillant le liquide neutralisé dans lequel vous avez effectué le titrage, de façon à éliminer l'alcool et à réduire le volume de la solution à 15 cm^3 . Ajoutez 1,3 cm^3 d'acide sulfurique dilué à 35 pour cent. Ajoutez ensuite à chaud 3 cm^3 d'un mélange à parties égales d'acide nitrique et d'eau distillée. Laissez en contact exactement 10 minutes au bain-marie à 50° ou 60°. Laissez refroidir.

Versez le liquide dans une ampoule à décantation et rincez la fiole avec deux fois 5 cm^3 d'eau distillée. Versez un excès d'ammoniaque concentré et extrayez la strychnine par 15 cm^3 , 10 cm^3 et 5 cm^3 de chloroforme.

Distillez le chloroforme et dissolvez à chaud le résidu dans 30 cm^3 d'une solution d'acide chlorhydrique à 4 pour cent, filtrez après refroidissement sur un peu de coton mouillé, rincez avec 5 cm^3 d'eau distillée, versez la liqueur aqueuse dans une ampoule à décantation, déplacez par l'ammoniaque et extrayez par 50 cm^3 , puis 30 cm^3 d'un mélange éthéro-chloroformique contenant 30 cm^3 de chloroforme et 90 cm^3 d'éther éthylique.

Réunissez les liqueurs éthéro-chloroformiques, lavez-les avec 2 cm^3 d'eau que vous enlèverez par scutirage et distillez au bain-marie en deux fois, dans une fiole conique tarée de 150 cm^3 .

Achevez le dosage des alcaloïdes totaux volumétriquement comme dans le cas précédent, soit n' le nombre de cm^3 de solution décimormale d'acide ayant servi à saturer la strychnine. (P.M. = 334,4).

Teneur pour cent en strychnine du produit essayé :

$$n' \times 0,03344 \times 100$$

8

La poudre de fèves de St Ignace se dose de la même façon.

B)- EXTRAIT : Pas de modification sur le procédé de 1937.

C)- TEINTURE : Pas de modification sur le procédé de 1937.

++++
++++

PHARMACOPEES ETRANGERES

Nous allons indiquer rapidement les procédés de dosage des principales pharmacopées étrangères .

I - PHARMACOPEE ALLEMANDE : D.A.B.6 (36)

A)- SEMENCES : Elles doivent contenir au moins 2,5 pour cent d'alcaloïdes totaux. (P.M. moyen de 364,2)

Les alcaloïdes de 3 g de semences sont extraits par l'éther chloroforme (2/3 éther - 1/3 chloroforme) en présence de carbonate de sodium. On concentre au tiers après filtration et on extrait par l'eau + 5 cm³ d'acide chlorhydrique 0,1 N. Titrer la couche aqueuse par la potasse 0,1 N en présence de rouge de méthyle.

B)- EXTRAIT : Titre 15,75 à 16,21 pour cent en alcaloïdes totaux.

0,50 g d'extrait sont dissouts dans de l'eau acidulée, et les alcaloïdes sont extraits par le chloroforme en présence de soude et de carbonate de sodium. Agiter, ajouter de l'éther (en quantité double du chloroforme) clarifier par la gomme adragante et extraire par l'eau et un acide titré. Chauffer jusqu'à disparition de l'odeur de chloroforme et titrer par la potasse 0,1 N en présence de rouge de méthyle après refroidissement.

C)- TEINTURE : Titre 0,246 à 0,255 pour cent en alcaloïdes totaux. Elle est préparée à partir de la plante.

Pour le dosage, 20 g sont acidifiés par l'acide sulfurique, évaporés puis traités comme l'extrait.

II - PHARMACOPEE BELGE : Ier sup. 1940 (113)

Les semences servent à préparer poudre, extrait et teinture qui doivent être titrés.

A)- POUDRE : Titre 2,5 pour cent d'alcaloïdes totaux. Ramener au titre, si nécessaire, par l'amidon de riz.

Les alcaloïdes de 10 g de poudre sont déplacés par la

magnésie et le chlorure d'ammonium et extraits par le chloroforme. Après clarification par la gomme adragante, les $3/4$ du chloroforme sont évaporés; le résidu est repris par de l'eau acide, épuisé par un mélange éthéro-chloroformique ($2/3$ éther - $1/3$ chloroforme) en présence d'ammoniaque, et le nouveau résidu d'évaporation est repris par l'éther et séché jusqu'à poids constant.

B)- EXTRAIT : Titre 16 pour cent en alcaloïdes totaux.

Les alcaloïdes de 1,5 g de prise d'essai sont extraits par le mélange éthéro-chloroformique après déplacement par l'ammoniaque. Le résidu est repris par l'éther et séché jusqu'à poids constant.

C)- TEINTURE : Titre 0,25 pour cent en alcaloïdes totaux.

75 g de teinture sont évaporés, et le résidu acidifié est traité par l'éther pour enlever l'huile gênante. On pratique ensuite le dosage comme pour l'extrait.

III - PHARMACOPÉE BRITANNIQUE : B.P. 1953 (22)

La poudre de noix vomique, qui doit titrer au moins 1,20 pour cent en strychnine, sert à préparer un extrait sec, un extrait fluide (qui sert à son tour à préparer la teinture) et une poudre préparée, ajustée au moyen de lactose à 1,20 g pour cent en strychnine (limite 1,14 à 1,26) et qui doit être délivrée quand il est prescrit noix vomique ou poudre de noix vomique.

Il nous a semblé intéressant de citer intégralement les procédés de dosage indiqués par la B.P. 1953

A)- POUDRE : Ne contient pas moins de 1,20 pour cent en strychnine.

Peser exactement environ 10 g de poudre fine, et la mélanger avec 60 cm³ d'alcool à 95°, 5 cm³ de solution diluée d'ammoniaque et 20 cm³ de chloroforme. Bien agiter, laisser reposer une heure en agitant fréquemment, puis transvaser dans un appareil à extraction continue avec une plus grande quantité du mélange, et extraire pendant quatre heures.

(+) Retirer le solvant. Lui ajouter 5 cm³ d'alcool à 95°, 10 cm³ d'acide chlorhydrique N, 30 cm³ de chloroforme et 20 cm³ d'eau. Introduire dans une ampoule à décantation, et laver le flacon avec de l'acide chlorhydrique 0,1 N jusqu'à ce que les alcaloïdes soient totalement enlevés.

(++) Agiter, laisser séparer, et recueillir le chloroforme. Recommencer l'extraction avec de nouvelles portions de chloroforme de 5 cm³ chacune (2 fois). Mélanger les solutions chloroformiques, les agiter avec deux quantités successives, chacune de 10 cm³, d'acide chlorhydrique 0,1 N et rejeter le chloroforme.

Ajouter ces solutions acides à la première solution acide, les alcaliniser nettement par une solution diluée d'ammoniaque, et extraire les alcaloïdes en agitant avec des quantités successives, chacune de 20 cm³, de chloroforme, jusqu'à ce que les alcaloïdes soient totalement extraits. Retirer le chloroforme, ajouter 5 cm³ d'alcool à 95° et évaporer à sec.

Dissoudre le résidu dans un mélange de 15 cm³ de solution aqueuse d'acide sulfurique à 3 pour cent (poids sur volume) et 2 cm³ d'acide nitrique. Ajouter quelques cristaux de nitrite de sodium et laisser reposer 30 minutes à la température de 15 - 20°.

Transvaser dans une ampoule contenant 20 cm³ de solution de soude, agiter vivement pendant 2 minutes, puis agiter avec 20 cm³ de chloroforme. Séparer la solution chloroformique, la laver d'abord avec 5 cm³ de solution de soude, puis deux fois avec 10 cm³ d'eau. Continuer l'extraction avec des quantités successives de 10 cm³ de chloroforme jusqu'à complète extraction des alcaloïdes, en lavant chaque solution chloroformique séparément avec la solution de soude, puis avec deux volumes d'eau comme pour la première solution chloroformique.

Titrer la seconde eau de lavage par l'acide chlorhydrique 0,1 N en utilisant une solution de méthylorange comme indicateur. S'il faut plus de 0,1 cm³, laver les solutions chloroformiques réunies avec de nouvelles quantités d'eau (10 cm³ chaque fois) jusqu'à ce que la titration n'exige pas plus de 0,1 cm³ d'acide chlorhydrique 0,1 N.

Retirer le chloroforme, ajouter 5 cm³ d'alcool à 95°, évaporer et sécher une demi-heure à 100°. Dissoudre le résidu dans 10 cm³ d'acide chlorhydrique 0,1 N et titrer par la soude 0,1 N en présence de rouge de méthyle.

1 cm³ d'acide 0,1 N = 0,03344 g de strychnine.
Multiplier le résultat par 1,02 pour le corriger de la perte en strychnine.

Le dosage des alcaloïdes totaux n'est pas mentionné.

La Pharmacopée internationale (116) a adopté ce procédé de dosage, en substituant HCl à SO₄H₂ et en omettant la vérification de l'alcalinité des eaux de lavage du chloroforme avant l'évaporation finale.

B) - EXTRAIT SEC : Titre 5 pour cent de strychnine (limites : 4,75 - 5,25). C'est un extrait non dégraissé.

Peser exactement environ 3 g d'extrait, ajouter 20 cm³ d'alcool à 50° et chauffer sur un bain-marie pendant 10 minutes en agitant fréquemment. Filtrer sur un petit filtre, laver flacon et filtre avec des portions successives d'alcool à 50° chaud, jusqu'à complète extraction des alcaloïdes.

Evaporer à 20 cm³ environ, transférer dans une ampoule avec 5 cm³ d'alcool à 95°, 10 cm³ d'acide chlorhydrique N, et 30 cm³ de chloroforme, et continuer comme pour la poudre (++)

C) - EXTRAIT FLUIDE : Titre 1,5 pour cent (poids/volume) de strychnine. Limites : 1,425 - 1,575.

10 cm³ d'extrait, 10 cm³ d'acide chlorhydrique N, 30 cm³ de chloroforme et 20 cm³ d'eau sont traités comme ci-dessus(++)

D) - TEINTURE : 0,125 pour cent (poids/volume) de strychnine. Limites : 0,119 - 0,131.

Evaporer 100 cm³ de teinture sur un bain-marie jusqu'à réduction à 10 cm³ environ et continuer comme pour la poudre (+) .

IV - FORMULAIRE DES ETATS-UNIS : N.F.VIII (109)

La "Pharmacopeia of the United States of America, U.S.P. XIV" et son premier supplément ne contiennent ni la noix vomique, ni ses préparations. Ces produits étaient inscrits à l'U.S.P. XIII.

Nous avons indiqué les procédés de dosage inscrits sur le formulaire national N.F. VIII publié par "The American Pharmaceutical Association" en 1946.

Au N.F. VIII figurent la noix vomique qui sert à préparer un extrait sec, un extrait fluide et une teinture. Ce formulaire mentionne aussi une solution des alcaloïdes de la noix vomique (Nux Vomica Alkaloids Solution) contenant 3,2 pour cent d'alcaloïdes totaux à parties égales, en solution glycinée aqueuse, colorée par "Resorcin Brown".

Pour les préparations de noix vomique, seule est indiquée la teneur en strychnine, mais pour cette solution d'alcaloïdes, le contrôle exige le dosage des alcaloïdes totaux et de la strychnine.

A)- POUDRE : Elle doit contenir au moins 1,15 pour cent en strychnine.

Mettre 15 g de poudre dans un flacon avec 150 cm³, mesurés à 25°, d'un mélange de 3 volumes d'éther et 1 volume de chloroforme. Fermer le flacon, agiter, attendre une heure en agitant fréquemment mais doucement, puis laisser en contact une nuit à une température inférieure à 25°. Agiter le flacon pendant 15 minutes et laisser reposer à 25°, puis mettre dans une ampoule 100 cm³ exactement de solution éthéro-chloroformique, du chloroforme pour le lavage et ajouter 40 cm³ d'acide sulfurique à peu près N.

(+) Agiter 5 minutes, mettre la couche acide dans une autre ampoule, répéter l'extraction par des portions successives d'acide, jusqu'à extraction complète.

Réunir les solutions acides et, en présence d'un peu de papier de tournesol, ajouter 50 cm³ de chloroforme, une quantité suffisante d'ammoniaque pour le virage, puis 2 à 3 gouttes en plus. Agiter doucement l'ampoule pendant 10 minutes, séparer le chloroforme et recommencer l'extraction pour qu'elle soit complète. Extraire les chloroformes réunis par des fractions d'acide sulfurique à peu près N. Alcaliniser les solutions acides comme ci-dessus, puis extraire par le chloroforme.

Evaporer avec soin les solutions chloroformiques à sec sur un bain-marie. Reprendre le résidu à chaud par 15 cm³ d'acide sulfurique à 3 pour cent environ, refroidir à 25° et ajouter 3 cm³ d'un mélange à parties égales d'acide nitrique et de solution aqueuse de nitrite de sodium à 5 pour cent. Bien agiter et laisser reposer exactement 10 minutes à température ambiante.

Introduire la solution rouge dans une ampoule contenant 50 cm³ de chloroforme et 15 cm³ de soude 1/10, rincer le flacon avec de l'eau distillée qu'on ajoute dans l'ampoule. Ajouter encore une quantité suffisante de soude 1/10 pour avoir un virage net au tournesol, puis quelques centimètres cubes en plus. Recueillir le chloroforme dans une autre ampoule et continuer les extractions au chloroforme jusqu'à extraction complète.

Ajouter 10 cm³ d'eau aux chloroformes réunis; agiter doucement: le papier de tournesol doit indiquer qu'il n'y a plus qu'une faible alcalinité. Si l'alcalinité est trop élevée, mettre le chloroforme dans une autre ampoule et l'agiter encore avec 10 cm³ d'eau. Filtrer le chloroforme sur un filtre humecté de chloroforme, laver le filtre avec du chloroforme chaud et l'ajouter aux chloroformes précédents. D'autre part agiter les solutions aqueuses avec 5 cm³ de chloroforme qu'on filtre et qu'on ajoute aux précédents.

Evaporer les chloroformes réunis au bain-marie sans aller totalement à sec. Ajouter au résidu humide 7 cm³ d'acide sulfurique N, puis 30 cm³ d'eau distillée et chauffer sur bain-marie jusqu'à dissolution de l'alcaloïde et disparition d'odeur chloroformique. Refroidir à température ordinaire et titrer par la soude 0,02 N en présence de rouge de méthyle.

1 cm³ d'acide 0,1 N = 0,03344 g de strychnine.

B)- EXTRAIT SEC : Titre 7,40 g pour cent en strychnine.
Limites : 7 - 7,75.

1,50 g d'extrait sont mis à digérer au bain-marie dans une capsule, avec 10 cm³ d'alcool dilué acidifié par l'acide acétique, jusqu'à liquéfaction. Mettre dans une ampoule contenant 25 cm³ de chloroforme, rincer avec un peu d'alcool. Diluer la solution alcoolique avec un égal volume d'eau, rendre la solution alcaline, ajouter du chloroforme et de l'acide sulfurique, puis continuer comme pour la poudre (+).

C)- EXTRAIT FLUIDE : Titre 1,15 g de strychnine pour cent.
Limites : 1,05 - 1,25.

10 cm³ d'extrait sont additionnés de 30 cm³ de chloroforme, 5 cm³ d'eau et 5 cm³ d'ammoniaque. Agiter 1 minute et continuer l'extraction comme pour la poudre. (+)

D)- TEINTURE : Titre 0,115 g de strychnine pour cent (0,105 à 0,125)

100 cm³ de teinture sont évaporés à une température inférieure à 100° jusqu'à réduction à 20 cm³. Introduire dans une ampoule avec 30 cm³ de chloroforme, rincer le récipient avec 20 cm³ d'alcool dilué, les mettre dans l'ampoule et ajouter 20 cm³ d'eau et 5 cm³ d'ammoniaque. Agiter 1 minute, extraire par le chloroforme et continuer comme pour la poudre. (+)

V - PHARMACOPEE HELVETIQUE : 1949 (115)

Les semences de noix vomique servent à préparer un extrait sec, et la teinture s'obtient à partir de l'extrait .

A)- SEIENCES : Elles doivent renfermer au moins 2,5 pour cent en alcaloïdes totaux.

L'extraction se fait par l'éther-chloroforme (2/3 éther 1/3 chloroforme) en présence de carbonate de sodium. La solution éthéro-chloroformique filtrée est traitée par un acide 0,1 N. La couche aqueuse et les eaux de lavage sont titrées par la soude en présence de rouge de méthyle.

B)- EXTRAIT SEC : Titre 9,9 à 10,1 en alcaloïdes totaux pour cent .

L'extrait, délayé dans un peu d'eau, est agité avec du chloroforme en présence d'ammoniaque. La solution alcaloïdique est évaporée, le résidu repris par un peu d'alcool est évaporé à nouveau puis titré en retour par acidimétrie après dissolution dans l'alcool.

C)- TEINTURE : Titre 0,24 à 0,26 pour cent en alcaloïdes totaux.

La teinture évaporée est dosée comme l'extrait, mais la solution chloroformique est clarifiée par un peu de gomme adragante.

VI - PHARMACOPÉE ITALIENNE : 1950 (51)

Les semences de noix vomique servent à préparer un extrait sec et une teinture.

A)- SEIENCES : Elles doivent renfermer 2,5 pour cent en alcaloïdes totaux, qui sont dosés comme pour l'extrait en opérant sur 6 g de poudre dégraissée par l'éther de pétrole.

B)- EXTRAIT SEC : Titre 16 pour cent d'alcaloïdes totaux.

1,25 g d'extrait délayé dans un peu d'eau est traité par l'éther-chloroforme (2/3 d'éther- 1/3 de chloroforme) en présence d'ammoniaque. Le résidu d'évaporation éthéro-chloroformique est dissout dans un excès d'acide titré, puis dosé par la soude

en présence d'iodéosine, sous une couche de 1 cm d'éther.

C)- TEINTURE : Titre 0,25 pour cent en alcaloïdes totaux.
On la traite comme l'extrait, après évaporation de l'alcool.

++++
++++

COMPARAISON RAPIDE ENTRE LES DIFFERENTES PHARMACOPEES(+)

I - EXTRACTION DES ALCALOIDES TOTAUX

Pharmacopée FRANCAISE :

Par l'éther (3/4) chloroforme (1/4) en présence d'ammoniaque, pour poudre, extrait et teinture.

Pharmacopée ALLEMANDE :

Par le chloroforme (1/3) éther (2/3), en une fois pour la poudre, en deux temps-chloroforme puis éther- pour extrait et teinture. Les alcaloïdes sont déplacés par le carbonate de sodium.

Pharmacopée BELGE :

Par le chloroforme, après déplacement par magnésie et chlorure d'ammonium.

Pharmacopée BRITANNIQUE :

Par l'alcool (2/3) chloroforme (1/3) et appareil à extraction continue pour la poudre, l'alcool seul pour l'extrait sec, le chloroforme seul pour l'extrait fluide. Déplacement par l'ammoniaque.

Formulaire des ETATS-UNIS :

Par l'éther (3/4) chloroforme (1/4) pour la poudre, le chloroforme seul pour les préparations. Déplacement par l'ammoniaque.

Pharmacopée HELVETIQUE :

Par l'éther (2/3) chloroforme (1/3) pour les semences, chloroforme seul pour extrait et teinture. Déplacement par l'ammoniaque.

(+) Signalons que R. EDER et O. RUCKSTUHL (42) ont fait en 1944 une intéressante analyse critique des dosages des loganiacées dans différentes pharmacopées.

Pharmacopée ITALIENNE :

Par l'éther (2/3) chloroforme (1/3) pour la poudre, l'extrait et la teinture, après déplacement par l'ammoniaque.

II - SEPARATION STRYCHNINE - BRUCINE

Pharmacopée FRANCAISE :

Alcaloïdes dissouts dans l'acide sulfurique dilué et traités 10 minutes à 50-60° par l'acide nitrique au demi.

Pharmacopée BRITANNIQUE :

Alcaloïdes dissouts dans l'acide sulfurique dilué et traités 30 minutes à 15-20° par l'acide nitrique pur en présence de nitrite de sodium. Emploi d'un coefficient de correction.

Formulaire des ETATS-UNIS :

Alcaloïdes dissouts dans l'acide sulfurique dilué et traités 10 minutes à température ambiante par l'acide nitrique en présence de nitrite de sodium.

III - TITRATION DES ALCALOÏDES

Tous les procédés utilisent l'acidimétrie directe ou en retour en présence de rouge de méthyle, ou d'iodocotine (Italie).

C H A P I T R E I I

-:-:-

METHODES NON OFFICIELLES DE DOSAGE

Ces dernières années, les recherches se sont succédées pour essayer de trouver un procédé simple et précis, permettant non seulement le dosage des alcaloïdes totaux, mais aussi une séparation quantitative de la strychnine. L'extraction des alcaloïdes totaux est relativement facile, mais les difficultés commencent quand on veut séparer strychnine et brucine et toutes les méthodes envisagées prêtent à la critique.

Nous diviserons cette étude en trois parties: extraction et purification des alcaloïdes, séparation strychnine-brucine et titration proprement dite.

+++++
+++++
+++++EXTRACTION ET PURIFICATION DES ALCALOÏDES

Si la séparation des alcaloïdes des loganiacées a fait l'objet de nombreux travaux, leur extraction n'a guère été étudiée et pourtant elle semble bien être la cause de l'infidélité des dosages. Les chercheurs se sont tournés surtout vers l'usage de la chromatographie, et nous étudierons ces procédés en respectant - autant que possible - l'ordre chronologique et en indiquant le mode de titrage proposé, afin que le lecteur ait une idée de l'ensemble de chaque travail.

++++
++++

METHODES VOISINES DE CELLE DU CODEX

La méthode officielle est loin de donner satisfaction, et nous verrons plus loin les reproches qu'on peut lui faire .

Cependant peu de modifications ont été suggérées :

LACHAISE a consacré un important travail à cette méthode et nous avons déjà signalé ses remarques concernant la technique du Codex 1908. Les éditions suivantes ont adopté en partie ses conclusions.

Depuis l'édition de 1949 une seule amélioration, à notre connaissance, a été proposée, celle de L. REVOL et G. NOUVEL (121). Après avoir constaté que la méthode officielle aboutit à des chiffres nettement déficitaires (au moins 10 pour cent) et inconstants (122) les auteurs proposent de mettre d'abord l'extrait en suspension dans l'eau ammoniacale, et d'utiliser le chloroforme seul comme solvant, ce qui permet de supprimer le contact de 24 heures qui allonge le dosage. Le chloroforme est desséché par de la gomme adragante, puis filtré. Les alcaloïdes sont purifiés par passage en solution acide sulfurique (et non chlorhydrique qui donne des résultats trop faibles), puis extraits par le chloroforme après alcalinisation par l'ammoniaque. Après évaporation du chloroforme, on termine le dosage par volumétrie. La méthode est rapide, fidèle et assez exacte.

Un procédé original d'extraction a été utilisé par J. ALLEN et N. L. ALLPORT en 1940 (2) et il nous a paru intéressant de le noter. Les alcaloïdes totaux sont extraits rapidement par le tétrachloréthylène bouillant en présence de pipérazine, puis entraînés en solution aqueuse diluée d'acide sulfurique. La méthode se termine par un dosage colorimétrique de la strychnine seule.

Plus récemment, en 1953, B. SINGH et S. H. ZAHEER (133) ont choisi l'essence de térébenthine pour extraire les alcaloïdes totaux de noix vomiques exotiques.

++++ METHODES UTILISANT L'ALUMINE
 +++++

Les premiers travaux sur l'utilisation de l'alumine en analyse pharmaceutique semblent bien être ceux de H.VALENTIN(139) en 1935, puis H.VALENTIN et R. FRANK en 1936 (140), R. FRANK en 1937 (54) et enfin K.W. MERZ et R. FRANK en 1937 (104). La méthode a été en particulier appliquée aux préparations de noix vomique. Elle est très simple: une prise d'essai faible est dissoute dans 50 cm³ d'alcool à 70° qui sert de solvant, et qui est passé sur une colonne d'alumine MERCK anhydre très pure, traitée spécialement. L'éluat entraîne en une demi heure la totalité des alcaloïdes à l'état de base, tandis que les acides et les substances voisines restent adsorbées sur l'alumine. L'éluat concentré est titré par acidimétrie en retour. Mais ce procédé si simple n'était guère maniable et reproductible en raison de la qualité de l'alumine exigée. La possibilité d'un dosage des alcaloïdes par chromatographie était pourtant établie.

C.W. BROWLEE (24), en 1945, recommande aussi la chromatographie sur alumine pour le dosage des préparations de noix vomique.

Mais ce n'est qu'en 1951 que E. GRAF(65) indique un procédé très intéressant qui peut sembler assez différent des procédés utilisés habituellement en chromatographie; entre les mains de son auteur, la méthode a donné de très bons résultats pour de nombreuses préparations galéniques. Son principe est le suivant :

La poudre de plante, ou les préparations galéniques, évaporées s'il y a lieu, sont alcalinisées fortement puis triturées avec une quantité d'alumine telle que l'humidité soit absorbée. La masse ainsi obtenue ne donne dans les essais à blanc aucune alcalinité de l'éluat. Le solvant organique entraîne totalement les bases alcaloïdiques qui peuvent donc être titrées par acidimétrie. C'est ce procédé qui a servi de base à nos recherches.

En 1952, M.S. EL RIDI et K. KHALIFA (44) s'adressent aussi à la purification par chromatographie sur alumine pour obtenir un dosage correct de la strychnine par spectrophotométrie.

++++ EMPLOI DES RESINES ECHANGEUSES D'IONS

L'action de l'alumine ayant été ramenée à un échange d'ions par H. BÖHME et H. LAMPE (20), il était naturel qu'on songeât à utiliser les résines échangeuses d'ions pour purifier l'alcaloïde à doser.

Les travaux les plus importants concernant les préparations de loganiacées sont ceux de A. JINDRA en 1949 (80) et 1951 (81).

La comparaison des courbes de titrage obtenues avec la strychnine en solution alcoolique et la même quantité de strychnine dans une teinture de noix vomique révèle une influence nette des produits accompagnant l'alcaloïde dans la teinture: les résultats obtenus dans le cas de la teinture de noix vomique sont invariablement doubles de la figure théorique (par exemple 0,563 pour cent au lieu de 0,247).

Nous rapprocherons des résines échangeuses d'ions les silicates absorbants (type bentonite). R.CHARONNAT et J.ORMANCEY (28) les ont utilisés pour extraire les alcaloïdes, la strychnine en particulier, dans des analyses toxicologiques.

+++++ PROCEDES DE SEPARATION STRYCHNINE - BRUCINE

Si les procédés d'extraction des alcaloïdes totaux n'ont guère tenté les chercheurs, par contre, de nombreux essais ont été faits pour essayer d'obtenir une séparation quantitative strychnine-brucine à partir des préparations de loganiacées.

+++++ SEPARATION PAR PRECIPITATION SELECTIVE

La strychnine donne avec le ferrocyanure un complexe insoluble, la brucine un complexe soluble. Cette différence a été mise à profit dès 1883 par DUNSTAN et SHORT, et cette méthode

de séparation des deux alcaloïdes a été étudiée en particulier par M. GADREAU en 1927 (58) et par M. KOLTHOFF et J. LINGANE en 1934 (90). Mais la séparation des complexes par leur différence de solubilité nécessite plusieurs cristallisations successives pour débarrasser le précipité de strychnine des traces de brucine.

En 1940 J.ALLEN et N.L. ALLPORT (2) reprennent ces travaux et améliorent la méthode en ajoutant de l'acide oxalique à la solution d'alcaloïde dans l'acide sulfurique dilué. Ils obtiennent ainsi une précipitation rapide et sous forme cristalline, surtout si on refroidit momentanément la solution. La précipitation quantitative de strychnine est toutefois assez compliquée et nécessite centrifugation, clarification au kieselguhr et lavage (notons au passage que les auteurs dosent la strychnine par la réaction de MALAQUIN-DENIGES à la tétrahydrostrychnine).

La même année, G.M. HORN, K.L. KAUFMAN et S.G. MITTEL - STAEDT (75), au cours d'une récapitulation des meilleurs procédés de séparation de la strychnine et de la brucine, comparent les techniques indiquées par diverses pharmacopées (B.P. 1932, U.S.P. VIII et U.S.P. XI) et par quelques auteurs, et recommandent la précipitation sélective de la strychnine par la soude dans certaines conditions.

++++ SEPARATION PAR DIFFERENCE DU COMPORTEMENT CHROMATO-
++++ GRAPHIQUE DE LA STRYCHNINE ET DE LA BRUCINE

R. FISCHER et E. BUCHEGGER (52) étudiant en 1950 plusieurs solvants industriels notent que si, utilisés seuls, ils ne donnent aucune différence d'extraction, par contre leur mélange peut éluer plus facilement la strychnine que la brucine. Les meilleures séparations ont été obtenues avec des mélanges benzol + 1 pour cent de butanol ou 10 pour cent d'acétone, trichloréthylène + 15 pour cent d'acétone, ou tétrachlorométhane + 10 pour cent d'acétone.

La méthode adoptée fut alors celle-ci: les alcaloïdes sont extraits par le chloroforme selon la technique habituelle et le

résidu, dissout dans le trichloréthylène, est adsorbé sur alumine MERCK standardisée selon Brockmann, l'élution se faisant par 75 cm³ du mélange tétrachlorométhane + 9 pour cent d'acétone en volume pour obtenir la strychnine puis par l'alcool pour obtenir la brucine. Il faut respecter exactement le mélange pour avoir des résultats reproductibles. La prise d'essai est de 20mg environ d'alcaloïdes pour 10 g d'alumine. Le dosage final se fait par volumétrie.

K.B. JENSEN et L.B. SVENDSEN (77), après avoir noté que les constantes de dissociation indiquées par KOLTHOFF (89) sont trop voisines pour jouer un rôle dans la séparation des deux alcaloïdes, tiennent compte du rapport de solubilité. Pour être certain de la séparation, lors de la chromatographie, il faut utiliser deux liquides pour lesquels le rapport des coefficients de partage pour les deux alcaloïdes soit assez différent de 1. Ce rapport est élevé quand on emploie le couple eau-éther, mais la strychnine et la brucine passent très vite (R_f élevé) à travers la colonne, si bien que la différence entre les deux vitesses n'est pas suffisante pour permettre une séparation. Pour obtenir cette dernière, il faut donc diminuer cette vitesse de façon appréciable; ce résultat est obtenu par l'emploi de tampons de pH approprié. Plus le pH utilisé est bas, plus les valeurs du coefficient de partage augmentent. On emploie donc un tampon dont le pH soit assez bas pour que la séparation des deux substances devienne possible, sans être trop bas toutefois, pour ne pas allonger la durée de l'élution.

L'expérience menée sur 25 mg d'alcaloïdes purs en solution éthéro-chloroformique en utilisant 10 g de kieselguhr comme phase de support et 3 cm³ de tampon phosphate M/5 de pH 7 comme phase immobile donne les résultats suivants :

L'élution par l'éther entraîne la strychnine seule entre le 20ème et le 90ème cm³. La brucine est totalement retenue sur la colonne, même en poursuivant l'élution avec 70 autres cm³ d'éther.

L'élution ultérieure par le chloroforme entraîne au

contraire toute la brucine, et très rapidement, puisque l'alcaloïde se trouve pratiquement dans les 10 premiers cm³.

L'essai à blanc ne livrant pratiquement aucune alcalinité, le dosage des alcaloïdes se fait par acidimétrie.

Le procédé appliqué à la drogue (dont les alcaloïdes ont été extraits préalablement par le mélange éthéro-chloroformique en présence de carbonate de sodium) donne également une séparation très nette des deux alcaloïdes.

Nous n'avons pu, à notre regret, utiliser cette méthode, faute d'un kieselguhr convenable.

E. GRAF (65) avait obtenu une séparation analogue par l'éther et le chloroforme. Le mélange alcaloïdique alcalinisé par la potasse et trituré avec de l'alumine standardisée selon Brockmann est élué d'abord avec l'éther qui entraîne la strychnine, puis avec le chloroforme qui entraîne la brucine. La courbe publiée par l'auteur montre nettement cette séparation. Nous n'avons pas réussi à retrouver les résultats de E. GRAF dans nos expériences (sur lesquelles nous reviendrons plus loin), la brucine étant élue par l'éther.

Remarquons dès à présent que K.B. JENSEN et A.B. SVENDSEN, aussi bien que E. GRAF utilisent l'éther seul pour éluer la strychnine, alors que celle-ci passe pour insoluble dans ce solvant. Les critiques à la composition du mélange éthéro-chloroforme du Codex portent justement sur la pauvreté en éther, qui dissout la brucine et pas la strychnine. Cette question nous a semblé assez importante pour la traiter avec plus de détails dans le chapitre suivant.

++++
++++

SEPARATION PAR DESTRUCTION DE LA BRUCINE

Parmi les propriétés de la brucine, il en est une qui est fort intéressante pour nous, c'est son oxydation relativement facile pour donner des produits généralement colorés qui ne se conduisent plus comme des bases. Par contre, la strychnine résiste bien à l'oxydation, ce qui permet d'obtenir la

strychnine après destruction de la brucine.

L'idée première d'une destruction de la brucine semble revenir à GEROCK (59) qui, dès 1889, proposait de détruire le picrate de brucine en présence d'acide nitrique. BLANCHER (19) critique en 1903 ce procédé comme inconstant et donnant des résultats un peu trop discordants.

En 1894, KELLER (84) avait décrit un procédé où les alcaloïdes sont directement traités par l'acide nitrique en milieu sulfurique: la coloration rouge apparaît aussitôt. Mais GORDIN (61) qui étudie ce procédé en 1902, ne retrouve que 96 pour cent de la strychnine mise en oeuvre.

Pour expliquer cette perte il est amené à considérer que la concentration ou la durée d'action de l'acide nitrique sont trop grandes, à moins que ces deux circonstances ne s'unissent pour agir défavorablement. Après plusieurs essais, il modifie heureusement le procédé KELLER en diminuant le titre de l'acide nitrique et sa méthode est adoptée par la pharmacopée anglaise de l'époque.

L. LACHAISE (92) modifie très légèrement ce procédé en 1927 et depuis 1937 le Codex a adopté sa méthode.

En 1944 R. EDER et O. RUCKSTUHL (42) publient un travail d'ensemble sur les procédés de séparation de la strychnine et de la brucine, par précipitation de la strychnine au moyen du ferrocyanure de potassium ou par destruction de la brucine. Au cours de cette étude critique, ils essayent une destruction de la brucine par l'eau oxygénée: la brucine est bien détruite, mais il y a des pertes de strychnine.

Ils adoptent donc le procédé indiqué alors par la pharmacopée anglaise, le mode d'extraction étant celui de la pharmacopée suisse. En faisant la destruction pendant 15 minutes seulement à 16-17°, il n'y a pas lieu de faire intervenir de facteur de correction.

Les pharmacopées américaine et anglaise actuelles ont adopté un procédé de destruction de la brucine dans lequel le nitrite de sodium est associé à l'acide nitrique dont il accélère

l'action par la présence d'oxydes d'azote, ainsi que le notait HAGER en 1927 (69).

++++
++++

SEPARATION PAR SPECTROPHOTOMETRIE

Quelques auteurs ont préconisé le dosage de la strychnine en présence de brucine en se basant sur la différence des spectres d'absorption des deux alcaloïdes.

En 1951, K. JENTZSCH (78), après avoir constaté les nombreux inconvénients des techniques indiquées par les pharmacopées D.A.B. 6 et B.P. 1948, propose d'associer l'extraction du DAB 6 à un dosage spectrophotométrique des deux alcaloïdes suivant les indications de F. MAYER et M. HALAWA (103). La méthode peut même être utilisée sur une prise d'essai de 0,15 cm³ de teinture.

R.N. BHATTACHARYA et A.K. GANGULY (16), en 1952, proposent une formule pour calculer le pourcentage de chaque alcaloïde en mesurant l'absorption à 252 et 262 mμ.

I. BIGGS (17) a également indiqué un calcul du taux des alcaloïdes, mais en faisant des lectures à 255 et 302 mμ.

M.S. EL RIDI et K. KHALIFA (44) combinent les lectures photométriques avec une destruction de la brucine par le persulfate de potassium au lieu d'acide nitrique, l'ion nitrate étant absorbant à 302 mμ. La strychnine a un maximum d'absorption à 254 mμ et la brucine à 264 et 301 mμ.

En 1952 encore, P. DEMOEN et P. JANSSEN (34) remarquant que la littérature concernant les spectres dans l'ultra-violet des alcaloïdes de la noix vomique est incomplète et contradictoire, font une mise au point de cette question et décrivent les spectres obtenus avec l'appareil BECKMANN D U. Deux lectures, l'une à 261 mμ pour la somme de deux alcaloïdes, l'autre à 305 mμ pour la brucine seule, permettent d'obtenir à l'aide d'une courbe le pourcentage des deux alcaloïdes.

Un dosage par photométrie dans le visible a été tenté par

S. ROLLAND-LECLERCQ en 1947 (124). L'auteur s'était proposé d'adapter la réaction colorée de MALAQUIN-DENIGES au dosage de petites quantités de strychnine, puis d'étudier l'influence de la brucine sur cette coloration. Il utilise le Biophotocol de HELLIGE avec les écrans 440 et 520. Le coefficient d'extinction est fonction de la quantité de strychnine introduite (pour des prises d'essai de 0,1 à 0,5 mg), alors que dans les mêmes conditions les coefficients d'extinction de la brucine sont très faibles et même négligeables pour le filtre 520. Les autres corps introduits donnent lieu à une coloration insignifiante. S. ROLLAND-LECLERCQ a ensuite traité un mélange de strychnine et de brucine dans des proportions variables, mais il constate une augmentation importante et anormale de la coloration, d'où il n'a pas été possible de tirer une règle, les courbes présentant des allures brisées ou en S. Les autres filtres ne lui ont pas donné de meilleurs résultats et il conclut :

"l'intensité de la coloration dépend à la fois de deux inconnues, la quantité de strychnine contenue dans la prise d'essai et la quantité de brucine qui y est mélangée. Il n'est donc pas possible par l'étude de cette coloration de procéder à un dosage de strychnine en présence de brucine".

Il lui faut donc détruire la brucine par oxydation nitrique avant de doser la strychnine par la réaction de MALAQUIN-DENIGES.

+++++

+++++ TITRATION DES ALCALOIDES

+++++

Les différentes méthodes proposées pour le titrage peuvent se classer en cinq catégories :

- volumétrie
- gravimétrie
- colorimétrie
- polarographie et potentiométrie
- essai biologique

++++
 ++++ TITRATION PAR VOLUMETRIE

Les procédés sont nombreux et variés, mais nous ne retiendrons que l'acidimétrie.

Les alcaloïdes isolés sous forme de "bases" peuvent être titrés par un acide en présence d'un indicateur convenable. Le dosage peut avoir lieu directement ou en retour, l'excès d'acide étant titré par une base.

L'indicateur utilisé est le rouge de méthyle (Pharmacopée française et principales pharmacopées étrangères) le rouge de méthyle-bleu de méthylène (A. JINDRA), le vert de bromocrésol (JENSEN-SVENDSEN) ou l'iodéosine (Pharmacopée italienne).

++++
 ++++ TITRATION PAR GRAVIMETRIE

Utilisé au Codex 1908 pour les alcaloïdes totaux et au Codex 1937 pour la strychnine seule, le dosage gravimétrique est à l'heure actuelle pratiquement abandonné, les alcaloïdes restant toujours en combinaison avec le chloroforme: après 24 heures à l'étuve à + 100°, la strychnine garde encore 4 pour cent de chloroforme, et la brucine près de 10 pour cent. L.LACHAISE (92) qui avait bien étudié cette question avait établi des tableaux de correction.

On a préconisé la pesée des silicotungstates (39) ou des phosphomolybdates (7) d'alcaloïdes mais ces méthodes ne sont pas entrées dans la pratique courante.

++++
 ++++ TITRATION PAR COLORIMETRIE

La réaction la plus utilisée est celle que MALAQUIN indiquait en 1909 (100) et que DENIGES a étudiée en 1911 (35). On peut la résumer ainsi:

La tétrahydrostrychnine préparée extemporanément en hydrurant la strychnine par l'acide chlorhydrique et le zinc amalgamé fournit avec certains oxydants des colorations rouges suffisamment

proportionnelles aux quantités de strychnine mises en oeuvre pour qu'on puisse les utiliser au dosage colorimétrique de cet alcaloïde.

La méthode a été reprise par de nombreux auteurs qui l'ont plus ou moins modifiée et perfectionnée, mais elle nécessite un isolement de la strychnine, comme l'ont montré les expériences de S. ROLLAND-LECLERCQ (voir p.42).

Dès 1930, A. FRANCOIS (55) mettait à profit cette réaction pour le dosage colorimétrique de la strychnine dans les préparations du Codex.

J. ALLEN et N.L. ALLPORT (2) qui l'utilisèrent en 1940 isolent la strychnine par précipitation par le ferrocyanure de potassium: le précipité purifié est mis en solution dans l'acide chlorhydrique avec un peu d'amalgame de zinc et laissé 7 minutes en contact au bain-marie bouillant. Après refroidissement sous courant d'eau, on ajoute 0,05 cm³ d'une solution récente de nitrite de sodium au millièrme.

En 1942, N.L. ALLPORT et N.R. JONES (4) appliquent cette réaction au dosage de la strychnine dans les "tablets" et les solutions injectables. Ils soulignent la nécessité d'un amalgame actif ou réactivé par immersion momentanée dans une solution aqueuse de chlorure mercurique, suivie d'un lavage rapide à l'eau. Ils notent d'autre part que la coloration obtenue avec le chlorhydrate ou le sulfate de strychnine est plus faible que celle due à un même poids de strychnine sous forme de combinaison avec le ferrocyanure.

En 1943, Ch. BEDEL (14) propose une semi-microméthode de dosage de la strychnine basée sur cette coloration, et obtient des résultats "constants et suffisamment exacts".

En 1951, N.L. ALLPORT (3) reprend le procédé et insiste sur la nécessité du zinc amalgamé préparé extemporanément. Il note en outre que la brucine perturbe la réaction.

Une autre réaction colorée intéressante, est celle fournie par le réactif de MANDELIN. Nous avons pensé l'utiliser pour doser la strychnine en présence de brucine, mais les essais n'ont pas répondu à notre attente. Nous verrons plus loin un

procédé pour le dosage de la strychnine seule par cette réaction qui est susceptible de colorimétrie. Nous avons du reste trouvé un article de M. CHAMBON (27) qui signalait cette possibilité en 1946.

" J'ai constaté que la coloration orangé-rose de la solution aqueuse obtenue est très stable, même à une très grande dilution, et proportionnelle à la quantité de strychnine. Le réactif seul donne au contact de l'eau une coloration jaune peu intense... Ainsi donc, la réaction de MANDELIN devient une méthode de dosage colorimétrique de la strychnine extrêmement simple, et très spécifique. "

++++
++++

TITRATION PAR POLAROGRAPHIE ET POTENTIOMETRIE

En 1946, H.F.W. KIRKPATRICK (86), après de nombreux travaux sur le dosage polarographique des alcaloïdes, note qu'en milieu acétate, la strychnine donne des vagues catalytiques bien définies pour un pH supérieur à 5, le maximum de sensibilité étant à pH 8.

Mais comme la brucine donne des vagues qu'on ne peut séparer de celles de la strychnine si le pH est inférieur à 10, il faut ici encore, isoler la strychnine avant le dosage; l'auteur utilise le procédé de la B.P. 1932, qui lui donne une légère erreur par défaut, ou le procédé U.S.P. XII, qui permet de retrouver toute la strychnine si elle ne dépasse pas 0,1 mg.

En 1952, L. DOMANGE (38) étudie l'analyse potentiométrique et cite les travaux de PADILLA-VICIOSO en 1950 (111) et de L. SAUNDERS et R.S. SRIVASTAVA en 1951 (129) qui ont utilisé ce procédé pour le dosage du chlorhydrate de strychnine. C'est également ce procédé qui a été recommandé par JINDRA (voir pages 12 et 36)

En conclusion, seules les absorptions dans l'ultra-violet permettent un dosage de la strychnine en présence de brucine par un procédé physico-chimique. Dans tous les autres cas, l'isolement préalable de la strychnine s'impose.

++++
++++

TITRATION PAR ESSAI BIOLOGIQUE

Le temps de survie ou le pourcentage de mortalité des animaux expérimentés permettent un dosage de la strychnine.

L. LACHAISE(92) conclut de ses expériences sur les cobayes puis sur les chiens que

" la dose léthale pour un cobaye d'un extrait contenant plus de brucine que de strychnine serait de 9 unités, soit 9/100 de mg par gramme de cobaye. La dose léthale pour un extrait contenant plus de strychnine que de brucine est de 10/100 de mg par gramme de cobaye, soit 10 unités, comme s'il y avait de la strychnine pure".

Les résultats des méthodes chimiques et physiologiques de dosage de la strychnine dans les préparations de loganiacées étant concordants, c'est le dosage chimique de la strychnine seule qui s'impose dans l'analyse, mais il est indispensable de séparer les alcaloïdes pour doser la strychnine.

En 1946, H.I. TOFT (136) a proposé un test sur les jeunes souris comme base d'essai biologique de l'alcaloïde en chimie légale. L'auteur utilise le pourcentage de mortalité avec des doses de 0,2 à 4/1000 de mg par gramme de souris.

C H A P I T R E I I I

-:-:-

TRAVAUX PERSONNELS

Nous nous sommes proposé de rechercher une méthode susceptible de permettre un dosage rapide et précis des alcaloïdes des loganiacées dans les préparations inscrites à la pharmacopée française. Notre but n'était pas d'obtenir un procédé compliqué réservé à quelques chercheurs, mais au contraire un procédé ne nécessitant que des produits, des réactifs et du matériel à la portée de tout laboratoire, voire même de chaque pharmacien. C'est cette idée qui nous a sans cesse guidé au cours de notre travail.

Malgré tous les travaux qui ont été publiés, le choix judicieux d'une méthode de dosage n'est pas facile. La méthode officielle, elle-même, qui semble en théorie simple et parfaite, ne donne pas de résultats fidèles. Dans un article paru en 1951 aux Annales pharmaceutiques françaises, L. REVOL et G. NOUVEL(121) écrivent :

" Nous avons été amenés à comparer sur un même extrait les résultats obtenus à l'aide de diverses techniques, toutes volumétriques. Tandis que celle de la pharmacopée helvétique de 1949 s'accorde de façon très convenable avec les chiffres donnés par la méthode du Codex français de 1908, la méthode du Codex italien de 1940 conduit à des résultats un peu plus faibles (6 à 7 pour cent) et la méthode de la pharmacopée française de 1937, reprise par le Codex de 1949, aboutit à des chiffres très nettement déficitaires (au moins 10 pour cent, mais souvent beaucoup plus) et inconstants.

La méthode du Codex de 1937 ne conduit, en effet, à des chiffres à peu près constants que si les dosages sont effectués simultanément. Par contre, avec des réactifs différents, des durées différentes du temps d'extraction et de purification, les

résultats peuvent être très éloignés les uns des autres.

C'est ainsi qu'une trentaine de dosages effectués sur trois extraits de noix vomique (titrant autour de 16 pour cent d'alcaloïdes par la méthode du Codex 1908) nous ont conduit, par la méthode du Codex 1937, à des résultats s'échelonnant de quelques grammes d'alcaloïdes à 14,5 g pour cent au maximum!

Nos propres travaux ont confirmé les conclusions que nous venons de citer, et nous sommes obligé de reconnaître que le procédé des Codex 1937 et 1949, appliqué à l'extrait de noix vomique, donne des résultats "très nettement déficitaires... et inconstants".

Voici les résultats obtenus avec un extrait sec de noix vomique, qui n'a pas été lactosé. Par suite, l'homogénéité du mélange ne peut être incriminée, puisqu'il s'agit simplement d'un extrait mou desséché sous vide.

Les deux dosages pratiqués après la fabrication avaient donné 16,32 et 16,37 pour cent, ce qui faisait de cet extrait un produit conforme aux prescriptions du Codex.

Deux dosages effectués selon le procédé du Codex quelques mois plus tard nous ont donné les chiffres de 18,40 et 18,45 pour cent. Surpris par ces résultats, nous avons entrepris deux nouveaux dosages qui nous ont donné cette fois 12,82 et 12,85 pour cent !

Pour essayer de savoir le titre réel de cette préparation, nous avons effectué deux séries de dosage selon le procédé proposé par L. REVOL et G. NOUVEL (voir p.34) et nous avons obtenu 17,67 et 17,65 pour cent, puis 17,15 et 17,20.

Notre procédé qui sera exposé plus loin, a toujours donné des résultats comparables, de 18,42 à 18,63 pour cent.

Notons en passant que le procédé de REVOL-NOUVEL nous a conduit à un résultat à peu près identique à celui obtenu par ces auteurs qui trouvaient entre 17,1 et 17,8 pour un extrait titrant 18,2 pour cent par la technique du Codex 1908.

Pour avoir une référence, nous nous sommes adressé à un procédé rapide, mais, croyons nous, inattaquable, la méthode des essais rapides de DEBREUILLE(53). Voici le mode opératoire suivi:

"Dissoudre 0,10 g d'extrait dans 5 cm³ d'eau chlorhydrique diluée à 1 pour cent. Ajouter 9 cm³ d'iodomercurate de potassium en solution neutre diluée au dixième. Agiter, laisser reposer quelques instants. Filtrer. Le filtrat doit précipiter par une nouvelle addition de réactif. On répète l'essai en ajoutant 10 cm³ de réactif. Le filtrat ne devra plus précipiter par une nouvelle addition de réactif. Si ces conditions sont remplies, la teneur de l'extrait en alcaloïdes sera comprise entre 15,30 et 17 pour cent. Le coefficient de précipitation de 1 cm³ de réactif est de 0;00170 g d'alcaloïdes".

Pour l'extrait étudié, le filtrat reprécipite avec 10,5 cm³ de réactif (ce qui correspond à 18 pour cent d'alcaloïdes totaux) mais reste clair avec 11,2 cm³ de réactif, (ce qui correspond à 19 pour cent d'alcaloïdes totaux). Son titre est donc compris entre 18 et 19 pour cent.

En résumé, nos résultats ont été les suivants pour un même extrait:

Méthode du Codex	18,40 - 18,45	12,82 - 12,85
Méthode REVOL-NOUVEL	17,67 - 17,65	17,15 - 17,20
Méthode en cours d'étude	18,56 - 18,45	18,42 - 18,54

Nous croyons donc pouvoir dire, en accord avec le dosage de DEBREUILLE, que l'extrait analysé titrait 18,50 pour cent d'alcaloïdes.

Alors que L. REVOL et G. NOUVEL ont porté leurs recherches sur les causes d'erreur due à l'extraction, et ont tenté de les supprimer par des modifications convenables de la méthode du Codex, nous nous sommes orienté vers la chromatographie qui nous semble être le procédé d'avenir par sa simplicité et sa précision.

+++++
+++++
+++++

EXTRACTION ET PURIFICATION DES ALCALOÏDES

Le Codex n'indiquant toujours que le titre en alcaloïdes totaux des préparations de loganiacées, avant de nous intéresser à la séparation de la strychnine et de la brucine, nous avons d'abord essayé de réaliser une extraction de ces alcaloïdes par

une technique assez simple pour être utilisée facilement par un pharmacien et ne mettant en oeuvre que peu de matière.

Une méthode nous tentait, celle de K.W. MERZ et R. FRANCK (citée p. 35). Il serait en effet très séduisant de pouvoir verser la teinture de noix vomique sur une colonne d'alumine et d'obtenir un éluat assez pur pour permettre un dosage volumétrique. Mais cette méthode exige une alumine spéciale.

Nous avons à notre disposition l'alumine pour chromatographie PROLABO, et nous avons pu nous procurer de l'alumine MERCK anhydre très pure - grâce à l'obligeance d'un camarade étranger que nous remercions vivement ici - et de l'alumine MERCK standardisée selon Brockmann.

Pour pouvoir utiliser un procédé si simple, il fallait que l'alcool n'entraîne pas d'alcali par passage sur une colonne d'alumine. Nous avons donc été amené à effectuer le test d'alcalinité indiqué par D. VAN OS (voir p. 9) Cet essai nous a donné les résultats suivants : l'alumine PROLABO traitée par l'alcool lui communique une forte réaction alcaline; il en est de même pour l'échantillon d'alumine standardisée selon Brockmann.

Quant à l'alumine MERCK anhydre très pure, nous avons constaté une alcalinité nulle de l'éluat alcoolique pour un titre supérieur à 80° , mais pour une colonne de 10 g d'alumine éluee avec de l'alcool à 80° (titre supérieur à celui d'une teinture) chaque fraction de 20 cm³ d'alcool, neutre au départ, nécessite 0,2 cm³ d'acide 0,01 N pour être ramenée à la neutralité en présence de rouge de méthyle (ce pH de neutralité est sensiblement le même que celui du bleu de bromophénol indiqué par VAN OS).

Nous avons donc renoncé à ce procédé, faute d'une alumine convenable.

Le procédé de R. CHARONNAT et J. ORMANCEY (cité p. 36) qui utilise la bentonite pour extraire les alcaloïdes pourrait peut-être convenir, mais le problème de l'élution nous a paru délicat. De plus, il faut ajouter à cette extraction, une purification sur alumine, ce qui entraîne une seconde manipulation toujours susceptible de provoquer des pertes d'alcaloïdes.

Il n'était pas question de nous adresser aux résines échangeuses d'ions qui donnent, semble-t-il, des résultats précis, mais sont d'un emploi compliqué. De plus, il est difficile de s'en procurer.

Un seul procédé, celui de GRAF (décrit p. 35) semblait répondre à notre préoccupation de réaliser une méthode d'extraction des alcaloïdes assez simple pour être utilisée par un pharmacien et ne mettant en oeuvre que peu de matière première. De plus, la manipulation n'offre aucune difficulté, tous les réactifs peuvent être mis "à vue d'oeil", seule la substance à analyser devant être pesée.

++++
++++

CHOIX DU PROCEDE

L'exactitude des résultats d'une chromatographie d'alcaloïdes dépend de beaucoup de conditions, et si l'emploi d'alumines d'activité connue a éliminé certaines causes d'erreur, il n'en reste pas moins qu'un facteur extérieur, l'humidité par exemple, peut fausser des analyses. La pratique de la chromatographie est donc délicate.

GRAF (65) a montré que des composants normaux des plantes, tels que nitrates alcalins, sels ammoniacaux, sont susceptibles d'intervenir notablement dans les expériences. Donc, un procédé de dosage utilisant la chromatographie d'une solution d'alcaloïdes insuffisamment purifiés est à mettre de côté comme incertain.

Si on ne peut pas verser sur une colonne d'alumine une solution d'alcaloïdes insuffisamment purifiés par les méthodes habituelles d'extraction, par contre on peut, ainsi que l'a proposé GRAF (65), et nous l'avons déjà signalé page 35, alcaliniser une poudre de plante ou le produit d'évaporation d'une teinture par une quantité convenable de solution de potasse, et triturer la masse aqueuse alcaline avec une quantité d'alumine telle que l'humidité soit absorbée. Dans ces conditions, il est possible de faire une élution correcte de la poudre ainsi

préparée, placée en tube d'Allihn, et d'obtenir des résultats exacts par acidimétrie.

L'addition de potasse provoque non seulement la libération et l'hydrolyse des sels d'alcaloïdes, mais aussi une destruction ou une transformation de certaines matières gênantes.

Nous avons donc essayé de réaliser la méthode de GRAF. Ne disposant que d'une petite quantité d'alumine MERK, nous avons décidé d'utiliser l'alumine pour chromatographie PROLABO, puisque GRAF ne spécifiait pas une alumine spéciale.

Voici le procédé auquel nous nous sommes arrêté :

La solution alcaloïdique, sous un volume aussi faible que possible (de l'ordre de 1 à 2 cm³ au maximum) est alcalinisée, dans une capsule de porcelaine de taille moyenne, avec 2 cm³ environ de potasse en solution aqueuse à 40 pour cent.

Après contact et agitation au moyen d'un agitateur de verre pendant 30 secondes à une minute, on triture la masse alcaline avec 15 g environ d'alumine pour chromatographie PROLABO ajoutée par petites portions, pour obtenir une masse sèche et bien homogène, sans grumeaux, qui n'adhère nullement aux parois de la capsule

On verse alors cette poudre sur une couche d'alumine de 1 cm environ d'épaisseur, contenue dans un tube d'Allihn de 10 cm de hauteur et 2 cm de diamètre, et dont le fond est en verre frité assez gros (type 2 ou 3) pour permettre un écoulement facile du salvant.

Cet écoulement doit se faire assez lentement, à la vitesse de 1 à 2 gouttes par seconde, ce qui est important pour obtenir une bonne élution. Avec l'éther, une colonne bien préparée donne un tel écoulement sans qu'il soit généralement nécessaire d'utiliser une trompe à vide, sauf à la fin.

L'éluat était absolument incolore et se prêtait à un dosage direct par acidimétrie.

Mais il fallait vérifier que nos résultats étaient corrects et non faussement exacts: GRAF a en effet attiré l'attention sur la compensation qui pouvait parfois se produire entre un déficit en alcaloïdes et une alcalinité cédée par l'adsorbant lui-même.

++++
 ++++ ESSAIS PRELIMINAIRES

Il fallait tout d'abord s'assurer que le mélange potasse-alumine ne cédait aucune alcalinité au solvant. Nous l'avons vérifié par l'acide sulfurique 0,01 N en présence de rouge de méthyle-bleu de méthylène (nous verrons plus loin le procédé de dosage) qui vire du vert (alcalin) au violet (acide) en passant par le gris, avec une sensibilité de 0,1 cm³ d'acide 0,01 N, soit 2 gouttes.

Nous avons essayé comme éluant l'éther officinal sans peroxyde, (neutre avec le réactif utilisé), le chloroforme (dont le résidu d'évaporation repris par l'alcool donne une réaction neutre) ou un mélange des deux solvants: nous avons toujours obtenu un éluat parfaitement clair et présentant une réaction neutre (voir p.69)

Par contre, l'eau et l'alcool éthylique, qui renferme plus ou moins d'eau, dissolvent la potasse et présentent une réaction nettement alcaline, de même que l'acétone, à moins d'être parfaitement desséché, et le méthylal, même purifié.

Désirant nous limiter à ces solvants, nous avons donc le choix entre le chloroforme ou l'éther, ou un mélange des deux. Le chloroforme seul ne nous semble pas préférable à l'éther, car l'élution est alors difficile et lente, l'évaporation est plus longue et la moindre trace d'eau provoque un trouble. Il nous restait l'éther ou un mélange éther-chloroforme. Mais conviendraient-ils à l'élution des alcaloïdes ?

Nous avons alors conduit nos essais sur des solutions à 1 pour cent dans l'alcool à 70° de chacun des alcaloïdes (sulfate de strychnine à 5 molécules d'eau, P.M. = 428 ,et brucine base à 2 molécules d'eau , P.M. = 430), cherchant à déterminer la prise d'essai convenable et le solvant le mieux adapté.

Voici nos résultats concernant l'élution de 25 mg de strychnine (2,5 cm³ de solution à 1 pour cent) par des quantités variables de solvants : 40, 60 et 80 cm³. Le premier

mélange correspond à la formule du Codex 1908, le second à celle du Codex 1937 ou 1949.

Solvant	Quantité utilisée en cm ³	Acide 0,01 N en cm ³	Strychnine en mg dans la P.E.	Strychnine pour cent
Ether	40	3,45	14,76	59,04
	60	5,70	24,39	97,56
	80	5,80	24,82	99,28
Ether 1/6 CHCl ₃ 5/6 v/v	40	3,85	16,47	65,88
	60	5,70	24,39	97,56
	80	5,85	25,03	100,12
Ether 1/4 CHCl ₃ 3/4 v/v	40	4,20	17,97	71,88
	60	5,80	24,82	98,28
	80	5,85	25,03	100,12

Les conclusions sont simples: si les mélanges contenant du chloroforme extraient plus d'alcaloïdes que l'éther seul en employant seulement 40 cm³ de solvant, 60 cm³ en extraient sensiblement la même quantité que l'éther seul.

Nous avons donc utilisé l'éther seul qui a en plus l'avantage d'être récupérable presque quantitativement, de s'évaporer beaucoup plus rapidement et de permettre une élution plus facile.

Il pourrait paraître surprenant que l'on obtienne une bonne élution de la strychnine par l'éther, puisque cet alcaloïde passe pour insoluble dans ce solvant (LEBEAU-COURTOIS - 94). Et pourtant, nous ne sommes pas les premiers à constater ce résultat, puisque aussi bien K.B. JENSEN et A.B. SVENDSEN (77) que E. GRAF (65) utilisent l'éther seul pour éluer la strychnine d'une colonne chromatographique tandis que la brucine est éluee par le chloroforme.

Nous avons cherché si les quantités de strychnine retrouvées dépendaient de la quantité d'alcaloïde mise en jeu ou de la quantité d'éther utilisée pour l'élution.

Voici les résultats obtenus avec des quantités croissantes de strychnine et d'éluant:

Prise d'essai en mg	Quantité d'éther en cm ³	Acide 0,01 N en cm ³	Strychnine en mg dans la P.E.	Strychnine pour cent
20	40	2,80	11,98	59,90
	60	4,55	19,47	97,35
	80	4,65	19,90	99,50
25	40	3,45	14,76	59,04
	60	5,70	24,39	97,56
	80	5,80	24,82	99,28
30	40	4,20	17,97	59,84
	60	6,85	29,31	97,60
	80	7,00	29,96	99,76
40	40	5,10	21,82	54,55
	60	8,25	35,31	88,77
	80	8,70	37,23	93,07
	120	9,30	39,80	99,50
50	40	5,30	22,68	45,40
	60	8,30	35,52	71,04
	80	9,35	40,01	80,02
	120	11,30	48,36	96,72
50	40	4,30	18,40	36,80
	60	6,50	27,82	55,64
	80	8,00	34,24	68,48
	120	10,20	43,65	87,30

Les pourcentages d'alcaloïdes retrouvés sont à peu près les mêmes pour des prises d'essai de 20, 25, 30 ou 40 mg. Mais pour cette dernière dose, comme pour celle de 50 mg, nous n'avons jamais pu retrouver un chiffre absolu suffisant et le pourcentage d'alcaloïde élué dans les 80 premiers cm³ est notablement plus faible que pour les prises d'essai inférieures.

Il semble donc qu'il y ait un maximum vers 40 mg au-delà duquel l'extraction par l'éther n'est plus quantitative.

Dans les autres cas (moins de 40 mg) l'alcaloïde restant sur l'alumine après élution par 60 cm³ est facilement élué par 20 cm³ supplémentaires d'éther, soit au total 80 cm³ pour retrouver tout l'alcaloïde mis en jeu, à la précision du dosage final près (les chiffres varient, par exemple, de 24,8 à 25,2 mg pour une prise d'essai de 25 mg.)

Comme il faut compter en plus environ 10 cm³ d'éther pour humecter la colonne, qu'on ne peut récupérer qu'en faisant un vide poussé à la fin de l'élution ou en les déplaçant par 20 autres cm³ d'éther, nous utilisons, pour avoir une certaine marge, 120 cm³ d'éther, en faisant un vide moyen à la fin de l'élution (cette précaution n'étant d'ailleurs pas indispensable).

La brucine, dans des conditions identiques, est extraite dans les mêmes proportions que la strychnine, et son élution est totale avec 80 cm³ d'éther.

Un mélange à parties égales strychnine-brucine, soit en tout 50 mg d'alcaloïdes, est élué entièrement par 80 cm³ d'éther. Par conséquent, ce n'est pas le poids total d'alcaloïde qui gênait dans le cas de la strychnine seule, mais sans doute son insolubilité relative dans l'éther. En travaillant dans les limites de 20 à 30 mg d'alcaloïdes totaux, le dosage est précis et l'extraction est quantitative, la quantité de strychnine étant bien en dessous des 40 mg qui nous ont paru être une limite. Des essais pratiqués en faisant varier les proportions relatives des 2 alcaloïdes, le poids total restant 50 mg, nous ont donné les résultats suivants :

Prise d'essai en mg	Acide 0,01 N en cm ³	Alcaloïdes totaux en mg dans la P.E.	alcaloïde pour cent
20 bruc. + 30 strych.	11,65	50,00	100
25 bruc. + 25 strych.	11,60	49,79	99,4
30 bruc. + 20 strych.	11,60	49,79	99,4
20 bruc. + 20 strych.	9,30	39,92	99,8
15 bruc. + 25 strych.	9,25	39,70	99,25

Nous n'avons pas cru devoir faire de calculs proportionnels, les P.M. étant très voisins, et nous avons utilisé le coefficient moyen de 4,29255 mg d'alcaloïdes pour 1 cm³ d'acide 0,01 N. Le dosage à 1 goutte près, soit 0,05 cm³ entraîne une variation de 0,21 mg dans le résultat pour une prise d'essai de 50 mg.

++++
++++

APPLICATION AUX PREPARATIONS DE NOIX VOMIQUE

Ce procédé a été appliqué aux préparations de loganiacées du Codex, avec une prise d'essai correspondant à environ 25 mg d'alcaloïdes totaux.

Pour la poudre à 2,50 pour cent en alcaloïdes totaux, il faut prendre 1 g de poudre.

Pour un extrait à 16 pour cent, nous utilisons une prise d'essai de 0,20 g (32 mg d'alcaloïdes).

Pour la teinture titrant 0,25 pour cent, il faut 10 g seulement de prise d'essai.

Les résultats sont exprimés au moyen du coefficient du Codex.

1 cm³ d'acide 0,01 N correspond à 3,64 mg d'alcaloïdes totaux et l'erreur absolue, pour un dosage à 0,05 cm³ près, sera de 0,182 mg.

I - EXTRAIT DE NOIX VOMIQUE

0,20 g d'extrait sont dissouts dans 2 cm³ environ d'eau chaude, puis on ajoute 2 cm³ de potasse à 40 pour cent et on laisse en contact 1 minute en agitant avec un agitateur. On amène alors aussitôt à sec avec 15 g environ d'alumine ajoutées par petites portions et on verse la poudre sèche dans un tube d'Allihn au fond duquel se trouve une couche de 1 cm d'alumine pure. On élue avec 120 cm³ d'éther à raison de 1 à 2 gouttes par seconde en s'aidant au besoin d'un léger vide. Après évaporation, le résidu est dissout dans 10 cm³ environ d'alcool

à 90°C; on ajoute 20 cm³ d'eau distillée neutre et on titre par l'acide sulfurique centinormal en présence de rouge de méthyle-bleu de méthylène.

Voici les résultats obtenus à partir de l'extrait de noix vomique qui nous a servi aux essais préliminaires (voir p. 49)

Prise d'essai en g	Acide 0,01 N en cm ³	Alcaloïdes totaux en mg dans la P.E.	Titre en g pour cent
0,20	10,2	37,12	18,56
0,20	10,15	36,94	18,45
0,25	12,8	46,59	18,63
0,25	12,7	46,22	18,48
0,30	15,2	55,32	18,42
0,30	15,3	55,69	18,54

II - TEINTURE DE NOIX VOMIQUE

On évapore 10 g de teinture au bain-marie jusqu'à réduction à 1 ou 2 cm³ (pour chasser tout l'alcool) et on traite comme l'extrait.

Nous avons analysé deux teintures titrant 0,25 et 0,26 par le procédé du Codex, mais dont le titre, évalué par la méthode des essais limites de DEBREUILLE est compris entre 0,25 et 0,28 pour la première et 0,28 à 0,32 pour la seconde.

Teinture	Prise d'essai en cm ³	Acide 0,01 N en cm ³	Alcaloïdes totaux en mg dans la P.E.	Titre en g pour cent
I	10	7	25,48	0,254
	10	7,1	25,84	0,258
	20	14,2	51,68	0,258
	20	14,10	51,32	0,256
II	10	8	29,12	0,291
	10	7,90	28,75	0,287
	20	16,1	58,60	0,293
	20	16,2	58,96	0,294

III - POUDRE DE NOIX VOMIQUE

Les résultats devant être exprimés pour une poudre séchée à 100°, on dessèche 0,50 g de poudre jusqu'à poids constant et on utilise une quantité de poudre correspondant à 1 g de poudre séchée à 100°. On peut évidemment utiliser 1 g de poudre et faire la correction après le dosage.

Nous savons que la poudre de noix vomique est une poudre de graines dont les téguments sont très durs. Il faudra donc ici faire une hydrolyse acide préalable, pour rendre possible la pénétration du solvant dans les cellules.

Voici la technique de GRAF que nous avons adopté :

1 g de poudre mis dans une capsule de porcelaine est additionné de 10 cm³ environ d'alcool et 20 gouttes d'acide chlorhydrique. On évapore à sec au bain-marie. Après refroidissement, on ajoute 2 cm³ d'eau environ, on triture pendant 1 minute avec de la potasse à 40 pour cent, et on continue comme précédemment.

Prise d'essai en g	Acide 0,01 N en cm ³	Alcaloïdes totaux en mg dans la P.E.	Titre en g pour cent
I	7,2	26,20	2,62
I	7,3	26,57	2,65
I,50	10,8	39,31	2,62

++++
++++

APPLICATION AUX PREPARATIONS DE FEVES DE St IGNACE

Il convient de tenir compte de la teneur en alcaloïdes différente de celle de la noix vomique.

La prise d'essai sera choisie pour mettre toujours en oeuvre 25 mg environ d'alcaloïdes totaux :

Pour la poudre qui contient 2 g pour cent environ d'alcaloïdes totaux, la prise d'essai sera de 1 g, soit 20 mg d'alcaloïdes.

Pour la teinture qui titre de 0,40 à 0,50 pour cent, la prise d'essai sera de 5 g, soit 0,20 à 0,25 mg d'alcaloïdes.

I - TEINTURE DE FEVES DE St IGNACE

Le procédé est identique à celui utilisé pour la teinture de noix vomique.

La teinture qui nous a servi titrait 0,46 par la méthode du Codex et son titre, calculé par les essais limites de DEBREUILLE était compris entre 0,46 et 0,51 g pour cent en alcaloïdes totaux.

Prise d'essai en cm ³	Acide 0,01 N en cm ³	Alcaloïdes to- taux en mg dans la P.E.	Titre en g pour cent
5	6,5	23,66	0,473
5	6,4	23,29	0,465
10	13	47,32	0,473
10	13,2	48,04	0,480

II - POUDRE DE FEVES DE St IGNACE

Le dosage se fait comme pour la poudre de noix vomique.
Voici les résultats obtenus :

Prise d'essai en g	Acide 0,01 N en cm ³	Alcaloïdes to- taux en mg dans la P.E.	Titre en g pour cent
0,50	2,80	10,19	2,03
I	5,70	20,74	2,07

+++++
+++++
+++++

SEPARATION STRYCHNINE-BRUCINE

Nous pensons qu'il serait souhaitable, comme le proposaient Al. GORIS, A. LIOT et M.M. JANOT, An. GORIS (64) et à la manière des pharmacopées britannique, suédoise, danoise et des Etats-Unis, d'exprimer le titre des préparations de loganiacées d'après le taux de strychnine qu'ils renferment. Nous nous sommes donc proposé de rechercher un procédé rapide, permettant d'obtenir quantitativement, sous une forme dosable facilement, la strychnine contenue dans les préparations étudiées.

Examinons les différents procédés proposés .

La précipitation sélective de la strychnine par le ferrocyanure, utilisée par J. ALLEN et N.L. ALLPORT n'a pas retenu notre attention, du fait de la séparation délicate, compliquée et longue du précipité.

Les séparations basées sur la différence de comportement des deux alcaloïdes sur colonne chromatographique nous paraissaient d'un emploi plus facile. Nous n'avons pu essayer le procédé indiqué par K.B. JENSEN et A.B. SVENDSEN (p. 38) faute d'un kieselguhr convenable.

Nous avons essayé le procédé de séparation indiqué par E. GRAF (65): après adsorption sur l'alumine MERCK standardisée selon Brockmann, l'éther élue la strychnine seule, la brucine étant ensuite entraînée par le chloroforme.

Malheureusement, soit du fait de l'échantillon d'alumine utilisé, soit par suite d'une application défectueuse de cette technique, nous n'avons jamais constaté une telle séparation dans nos essais.

De l'alumine MERCK standardisée suivant Brockmann est ajoutée à 20 mg de brucine pure, ou à des mélanges en proportion variable de strychnine et brucine (40 à 60 pour cent en strychnine), en présence de 2 cm³ de potasse à 40 pour cent, puis élue par 40 cm³ d'éther: nous avons toujours retrouvé de la brucine dans l'éluat, caractérisée facilement par la coloration

rouge intense qu'elle donne avec l'acide nitrique. Comme cette réaction est trop sensible pour donner une idée de la quantité de brucine présente, nous avons dosé la brucine ou les alcaloïdes totaux, suivant les essais, par acidimétrie, et nous avons obtenu entre 60 et 90 pour cent des alcaloïdes mis en jeu. Nous pensons qu'il faut incriminer l'alumine que nous avons utilisée, mais nous avons dû abandonner ces essais, aucun résultat positif n'ayant été obtenu, même en faisant varier la quantité de potasse ou le pourcentage des deux alcaloïdes.

La spectrophotométrie dans l'U.V. ne répondait pas à l'objet de notre recherche, par suite du matériel coûteux qu'elle nécessite. La colorimétrie de la réaction de MALAQUIN - DENIGES n'avait donné à S. ROLLAND-LECLERCQ (p. 41) que des résultats négatifs.

Nous avons pensé utiliser la réaction de MANDELIN; mais si elle conduit à d'excellents résultats pour la strychnine seule, la présence de brucine donne une coloration très forte qui masque complètement celle due à la strychnine (p. 44).

Il ne nous restait donc plus comme solution qu'une destruction de la brucine.

La destruction de la brucine par le procédé classique de GORDIN paraissait un peu long. De plus, il nécessite une reprise du résidu et une purification de la strychnine avant son dosage, ce qui risquait, avec notre procédé qui utilise très peu de produit, de provoquer quelques pertes.

Ne serait-il pas possible de détruire la brucine par l'acide nitrique, plus rapidement que par la méthode classique, quand on a affaire à très peu d'alcaloïde ?

Dans ce but, nous avons traité de la brucine par l'acide nitrique pur, et durant un temps très court. Puis nous avons essayé ce procédé en présence de strychnine.

++++
++++

ESSAIS PRELIMINAIRES

Quelques milligrammes de brucine sont placés dans une capsule en présence d'acide nitrique au demi. La coloration rouge apparaît aussitôt, et au bout d'un temps variable on neutralise par de la potasse à 60 pour cent (pour éviter la dilution du mélange) et on extrait l'alcaloïde par le procédé chromatographique que nous venons d'étudier. L'éluat est pratiquement incolore.

Si le résidu de l'éluat éthéré donne une coloration rouge avec l'acide nitrique, c'est que toute la brucine n'a pas été détruite.

Nous avons tout d'abord cherché le temps minimum qui permettait une destruction totale de 50 mg de brucine par 1 cm³ d'acide nitrique au demi: ce temps fut trouvé égal à 1 minute. Comme nous n'avons jamais cette quantité de brucine dans notre prise d'essai, 1 cm³ d'acide nitrique au demi, pendant 1 minute détruira certainement toute la brucine de celle-ci.

Puis nous avons étudié l'influence de la quantité d'acide et du temps de contact sur le sulfate de strychnine. Voici les résultats obtenus pour une prise d'essai de 20 mg.

Quantité de NO ₃ H 1/2	Temps de contact	Acide 0,01 N en cm ³	Strychnine en mg dans la P.E.	Strychnine pour cent
0 cm ³	0 min.	4,65	19,90	99,5
1	1	4,65	19,90	99,5
1	1 ½	4,65	19,90	99,5
1	2	4,65	19,90	99,5
1	3	4,6	19,68	98,4
2	1	4,6	19,68	98,4
2	2	4,5	19,26	96,3
2	3	4,4	18,23	95

Nous constatons que la strychnine est retrouvée quantitativement après un contact de 2 minutes avec 1 cm³ d'acide nitrique au demi. Si une faible partie de la strychnine est détruite, elle est inférieure à la précision du dosage et on ne peut en tenir compte.

Nous avons donc une certaine latitude, puisque 1 minute suffit pour détruire la brucine, tandis que 2 minutes ne provoquent pas de perte appréciable de strychnine.

Nous avons alors effectué des dosages de strychnine en présence de brucine par le procédé suivant :

Les alcaloïdes placés dans une capsule, sont triturés au moyen d'un agitateur, avec 1 cm³ d'acide nitrique au demi pendant 1 minute exactement. On ajoute alors aussitôt 2 cm³ de potasse à 60 pour cent et on amène à sec après quelques secondes avec 15 g d'alumine ajoutés par petites portions.

On élue par 120 cm³ d'éther et on titre le résidu par acidimétrie directe après dissolution dans un peu d'alcool.

Prise d'essai en mg	Acide 0,01 N en cm ³	Strychnine en mg dans la P.E.
20 strychnine 10 brucine	4,60	19,68
20 strychnine 20 brucine	4,65	19,90
20 strychnine 30 brucine	4,65	19,90

Mais si ce procédé est, pour de faibles quantités d'alcaloïdes, plus rapide que le procédé classique, il nécessite cependant une séparation et purification de la strychnine, après destruction de la brucine.

Nous nous sommes alors demandé s'il ne serait pas possible de détruire la brucine par oxydation, directement sur le produit galénique étudié, avant l'extraction des alcaloïdes.

Nous avons fait des essais sur l'extrait de noix vomique, en recherchant si la brucine avait été entièrement détruite, et si la strychnine était quantitativement retrouvée. Pour cela, nous avons comparé les résultats obtenus par action de l'acide nitrique sur les alcaloïdes préalablement isolés par notre procédé chromatographique (p. 58) et par action directe sur l'extrait dissout dans 1 à 2 cm³ d'eau.

La durée du contact de l'acide avec le produit à titrer doit être un peu augmentée, sans doute à cause des substances diverses qui accompagnent les alcaloïdes dans l'extrait. Le tableau ci-dessous donne les résultats obtenus pour 0,20 g d'extrait, et permet de trouver le temps de contact le meilleur.

Procédé utilisé	Acide 0,01 N en cm ³	Strychnine en mg dans la P.E.	Brucine
Nitration des alcaloïdes isolés 1 min.	5,4	18,03	néant
Nitration directe 1 min.	5,5	18,37	présence
Nitration directe 1 m.30	5,4	18,03	néant
Nitration directe 2 min.	5,4	18,03	néant

Avec un contact de 1 min.30 la destruction de la brucine est totale et les résultats sont comparables à ceux obtenus par action de l'acide nitrique au demi sur les alcaloïdes isolés.

La présence de lactose - utilisé pour ramener un extrait trop fort à son titre normal - ne gêne pas cette oxydation. Par contre la présence d'alcool (teinture insuffisamment évaporée) l'entrave.

Pour la poudre, 1 cm³ d'acide au demi n'est pas toujours suffisant. Le temps de contact devrait être alors supérieur à 5 minutes, et il vaut mieux mettre 2 cm³ d'acide au demi qui, en 1 minute 30 détruisent toute la brucine.

++++
++++

PROCEDE UTILISE - APPLICATION AUX PREPARATIONS
DE NOIX VOMIQUE

Nous avons, après tous nos essais, utilisé avec succès le procédé suivant pour le dosage de la strychnine dans les préparations de loganiacées.

La prise d'essai, dissoute dans le minimum d'eau (1 à 2 cm³) est triturée pendant 1 minute 30 à 2 minutes avec 1 cm³ d'acide nitrique dilué au demi. (La solution se teinte en rouge sang). Puis on ajoute 3 cm³ de potasse à 60 pour cent et on laisse en contact 1 minute en agitant avec un agitateur (la capsule étant trempée dans l'eau froide pour éviter un échauffement du produit), on amène alors aussitôt à sec avec 15 g environ d'alumine ajoutés par petites portions, et on verse la poudre sèche dans un tube d'Allihn, au fond duquel se trouve déjà une couche de 1 cm d'alumine pure. On élue avec 120 cm³ d'éther à raison de 1 à 2 gouttes par seconde, en s'aidant au besoin d'un léger vide. Après évaporation, le résidu est dissout dans 10 cm³ d'alcool à 90°, on ajoute 20 cm³ d'eau distillée neutre et on titre par l'acide sulfurique centinormal en présence de rouge de méthyle-bleu de méthylène.

I - EXTRAIT DE NOIX VOMIQUE

La prise d'essai est de 0,20 g (comme pour les alcaloïdes totaux). Voici les résultats obtenus avec l'extrait de noix vomique déjà utilisé, et titrant 18,50 g en alcaloïdes totaux par notre procédé.

Prise d'essai en g	Acide 0,01 N en cm ³	Strychnine en mg dans la P.E.	Strychnine: titre en g pour cent	Pourcentage de strychnine
0,20	5,4	18,03	9,01	48,7
0,20	5,4	18,03	9,01	48,7
0,30	8,1	27,05	9,00	48,7

II - TEINTURE DE NOIX VOMIQUE

10 g de teinture sont évaporés jusqu'à réduction à 1 cm³ (ce qui est important, l'alcool empêchant l'oxydation de la brucine par l'acide nitrique), puis traités par l'acide nitrique. Continuer comme pour l'extrait.

Voici les résultats obtenus avec deux teintures, titrant respectivement (I): 0,257 g pour cent d'alcaloïdes totaux et (II): 0,292 g pour cent.

Teinture	Prise d'essai en cm ³	Acide 0,01 N en cm ³	Strychnine en mg dans la P.E.	Strychnine titre en g pour cent	Pourcentage de strychnine
I	10	3,5	11,69	0,116	45,5
	20	7,1	23,71	0,118	46
II	10	4,3	14,36	0,143	49
	20	8,5	28,39	0,142	48,8

III - POUDRE DE NOIX VOMIQUE

L'oxydation nitrique est possible directement ici aussi, après hydrolyse acide.

Une quantité de poudre correspondant à 1 g de poudre desséchée est placée dans une capsule de porcelaine et triturée avec 10 cm³ d'alcool environ, puis on ajoute 20 gouttes d'acide chlorhydrique concentré. On porte au bain-marie jusqu'à évaporation à sec et après refroidissement, on ajoute 1 cm³ d'eau et 2 cm³ d'acide nitrique au demi qu'on laisse agir pendant 1 minute 1/2 à 2 minutes. On continue comme précédemment, en utilisant 4 cm³ de potasse à 60 pour cent.

Voici les résultats obtenus avec une poudre titrant, par notre procédé, 2,62 g pour cent d'alcaloïdes totaux.

Prise d'essai en g	Acide 0,01 N en cm ³	Strychnine en mg dans la P.E.	Strychnine titre en g pour cent	Pourcen- tage de strychnine
1	3,6	12,02	1,20	45,8
1	3,7	12,35	1,23	47,1
1	3,7	12 35	1,23	47,1

++++
 ++++ APPLICATION AUX PREPARATIONS DE FEVES DE St IGNACE

Nous utilisons le même procédé.

I - TEINTURE DE FEVES DE St IGNACE COMPOSEE

10 g de teinture sont évaporés jusqu'à réduction à 1 cm³ pour chasser entièrement l'alcool qui gênerait l'oxydation par l'acide nitrique. Continuer comme pour l'extrait de noix vomique.

Nous avons utilisé une teinture titrant 0,473 pour cent d'alcaloïdes totaux par notre procédé .

Prise d'essai en cm ³	Acide 0,01 N en cm ³	Strychnine en mg dans la P.E.	Strychnine titre en g pour cent	Pourcen- tage de strychnine
10	8,4	28,05	0,280	59,2
10	8,3	27,72	0,277	58,5
5	4,2	14,02	0,280	59,2

II - POUDRE DE FEVES DE St IGNACE

Une quantité de poudre correspondant à 1 g de poudre sèche est traitée comme la poudre de noix vomique.

Voici les résultats obtenus avec une poudre titrant 2,07 pour cent en alcaloïdes totaux par notre procédé:

Prise d'essai en g	Acide 0,01 N en cm ³	Strychnine en mg dans la P.E.	Strychnine : titre en g pour cent	Pourcentage de strychnine
1	3,70	12,35	1,23	59,5
1	3,75	12,52	1,25	60,4

+++++
+++++
+++++

TITRATION FINALE

Dans tous nos essais, les alcaloïdes isolés ont été titrés par acidimétrie directe. Nous avons utilisé l'indicateur coloré suivant: bleu de méthylène et rouge de méthyle, qui est vert en milieu "alcalin" (pH supérieur à 6,4) gris bleu au moment du virage (pH de 6,4 à 4,2) et violet en milieu "acide" (pH inférieur à 4,2)

Ce réactif se prépare en mélangeant une solution de 0,10 g de rouge de méthyle dans 80 cm³ d'alcool absolu avec une solution de 0,05 g de bleu de méthylène dans 20 cm³ d'eau distillée.

Le virage se fait avec 0,1 cm³ d'acide 0,01 N. Comme ce virage a lieu à un pH de 5, il arrive que l'eau fraîchement distillée donne une coloration verte (correspondant à un pH de 7) qui passe au violet par addition de 1 goutte d'acide 0,01 N (soit 0,05 cm³). Nous considérons comme neutre toute solution qui passait au violet dans de telles conditions.

Notre acide centinormal était ajusté en présence de 5 gouttes de cet indicateur coloré en dosant 40 mg de brucine base dissous dans 10 cm³ d'alcool et 20 cm³ d'eau distillée. L'acide est ainsi titré en tenant compte de l'indicateur utilisé et de l'opérateur.

Un centimètre cube d'acide centinormal correspond à 3,34 mg de strychnine base et 3,64 mg d'alcaloïdes totaux.

Mais il faut faire ici une remarque importante. Ce coefficient est le poids moyen de la strychnine et de la brucine. Or, il n'est exact que si ces deux alcaloïdes se trouvent en quantité égale dans le produit étudié.

Al. GORIS, A. LIOT et M.M. JANOT, An. GORIS (64) en particulier insistent sur le fait que "cette proportion n'est pas rigoureusement exacte. Le plus souvent les graines sont plus riches en brucine qu'en strychnine, mais on en trouve chez qui c'est l'inverse qui existe. En tous cas, la proportion de 50 pour cent est une exception".

Nous avons recherché (comme nous l'avions signalé p. 44) s'il ne serait pas possible de doser la strychnine en présence de brucine par la réaction de MANDELIN. La coloration donnée par la brucine est trop forte et masque celle due à la strychnine, mais le procédé est applicable à une solution de strychnine :

A 0,5 cm³ de solution alcaloïdique, on ajoute 0,2 cm³ de solution de sulfovanadate d'ammoniaque au centième dans l'acide sulfurique et on laisse une minute en contact, en triturant avec un agitateur. La coloration, d'abord bleu violet intense, vire lentement au rouge-rosé. On ajoute alors 10 cm³ d'eau et on mesure la densité optique à 490 mμ.

Des lectures faites avec le spectrophotomètre de COLEMAN (tube de 8 mm de diamètre) montrent que l'absorption est maximum pour des longueurs d'onde comprises entre 470 et 500 mμ.

Nous avons adopté 490 et la densité optique est alors une fonction linéaire de la quantité d'alcaloïde, pour des quantités de 1 à 5 mg de strychnine. Le réactif seul donne au contact de l'eau une coloration jaune peu intense.

On pourrait aussi - comme le proposait M. CHAMBON (27) qui utilisait 0,5 cm³ de réactif au 1/200 - diluer avec 10 ou 15 cm³ d'eau et comparer la teinte obtenue au colorimètre, avec un étalon réalisé dans les mêmes conditions à partir de 1 mg de sulfate de strychnine. La solution orangé-rouge obtenue est stable pendant plusieurs heures et nos résultats confirment cette observation.

Nous n'avons pas utilisé ce procédé, l'acidimétrie nous donnant une précision suffisante pour une plus grande facilité d'exécution.

+++++

+++++ CONCLUSIONS

+++++

Nous avons adapté un procédé chromatographique simple à l'extraction et à la purification des alcaloïdes des loganiacées. Nous avons utilisé le procédé indiqué par GRAF mais nous avons employé l'alumine pour chromatographie PROLABO et l'éther au lieu du chloroforme pour l'élution.

Pour la séparation strychnine-brucine nous utilisons également l'alumine PROLABO, et la séparation ne pouvant pas alors se faire par chromatographie (comme avec de l'alumine standardisée selon Brockmann) nous avons été amené à mettre au point un procédé de destruction de la brucine directement dans le produit galénique étudié.

Une extraction par un procédé classique n'est pas nécessaire, les alcaloïdes des produits à étudier étant directement élués par l'éther après action de la potasse sur ceux-ci et trituration avec de l'alumine.

L'éluat est suffisamment pur pour permettre un dosage direct par acidimétrie.

Dans le cas des dosages de la strychnine seule, une seule élution est nécessaire puisque la destruction de la brucine se fait directement sur le produit à doser.

Les dosages effectués avec quelques produits titrés nous ont donné des résultats satisfaisants.

D E U X I E M E P A R T I E

S O L A N A C E E S

-:-:-:-

C H A P I T R E I

-:-:-

SOLANACEES OFFICINALES

METHODES OFFICIELLES DE DOSAGE

L'action des solanacées est due surtout à des alcaloïdes, les uns spéciaux, les autres formant un groupe intéressant, les tropéïnes de LADENBURG, alcaloïdes mydriatiques, dont les principaux sont l'hyoscyamine et l'atropine, de même formule, et la scopolamine ou hyoscine.

Nous avons suivi ici un plan identique à celui qui nous a servi dans l'étude des loganiacées.

+++++
+++++
+++++

SOLANACEES INSCRITES AU CODEX 1949

La principale est la belladone - *Atropa Belladonna* L. - dont la partie employée est la feuille, qui doit être récoltée sur la plante prête à fleurir.

A partir de la poudre de feuille, préalablement titrée, on prépare l'extrait et la teinture de belladone, les cigarettes de belladone et l'huile de jusquiame composée.

La stramoine ou datura - *Datura Stramonium* L. - dont on emploie également la poudre de feuille, sert à la préparation d'une teinture, de cigarettes de stramoine et de l'huile de jusquiame composée.

De la jusquiame noire - *Hyoscyamus niger* L. - on utilise d'une part la poudre de feuille pour la préparation de l'extrait et de la teinture, de l'huile de jusquiame composée et de la pommade aux bourgeons de peuplier, et d'autre part la poudre

de semences, qui entre dans la composition des pilules de cynoglosse opiacées.

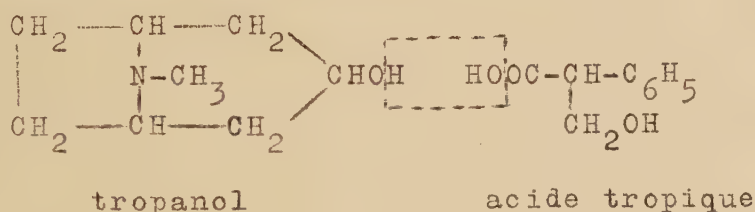
++++
++++

COMPOSITION CHIMIQUE

Les constituants intéressants du point de vue pharmacodynamique sont les alcaloïdes mydriatiques.

Belladone, datura et jusquiame renferment de l'hyoscyamine ainsi que son racémique l'atropine, en faible quantité dans la poudre si celle-ci a été correctement séchée.

Ce sont tous les deux des esters de l'acide tropique (acide phénylhydracrylique) et de la base tropine, mieux dénommée tropanol, puisque cette base possède une fonction alcool.



L'hyoscyamine est lévogyre, et l'atropine est son isomère optique racémique. Cette isomérisie provient de l'acide tropique qui est doué d'un pouvoir rotatoire dû à la présence d'un carbone asymétrique: l'acide tropique gauche donne l'hyoscyamine tandis que l'acide tropique racémique donne l'atropine. Malgré leur isomérisie, l'action physiologique de ces deux alcaloïdes est d'intensité très différente, l'hyoscyamine étant plus active que l'atropine.

Nous verrons plus loin que la différence d'activité varie avec l'essai physiologique utilisé, mais on peut admettre que l'hyoscyamine est de deux à six ou huit fois plus active que l'atropine.

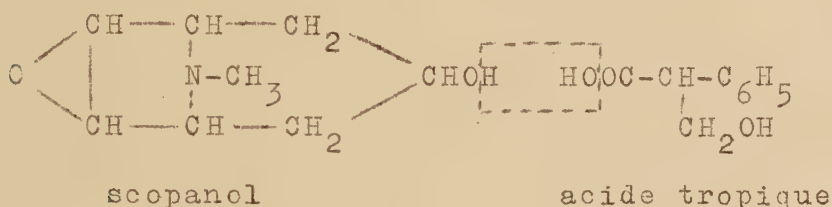
On trouve également un corps voisin, l'atropamine ou apo-atropine, qui est un ester du tropanol, mais avec l'acide atropique.

Il est connu que la jusquiame et la stramoine possèdent

également un autre alcaloïde actif, la scopolamine ou hyoscine. Il a été prouvé que la belladone renferme également de la scopolamine. Sa présence a été indiquée dans la belladone par J.M. ROWSON (127) en 1944 et ses résultats ont été confirmés par W.C. EVANS et M.W. PARTRIDGE (47) en 1948 et 1952 (48) ainsi que par GSTIRNER et STEIN (67).

L'hyoscine est un ester de l'acide tropique avec une base voisine du tropanol, le scopanol, qui au cours de l'hydrolyse se transforme en oscine ou scopoline.

L'hyoscine répond donc à la formule :



Sous l'action des alcalis, l'hyoscine s'isomérisé et donne le composé racémique ou atropine de HESSE.

La scopolamine est en réalité la (1)hyoscine, mais comme c'est elle qui prédomine dans la plante, la littérature confond souvent ces deux termes. Les auteurs anglo-saxons utilisent le terme de hyoscine. Pour éviter la confusion avec le terme hyoscyamine, et les ouvrages français adoptant généralement le mot scopolamine, c'est ce terme que nous emploierons également.

La poudre de jusquiame renferme une base volatile, le tétraméthylldiaminobutane. La poudre de belladone renferme, à côté des alcaloïdes mydriatiques, trois bases volatiles qui sont la pyridine, la N-méthylpyrrolidine et la N-méthylpyrrolidine. Ces corps ont été mis en évidence par GORIS et LARSONNEAU (62) et se trouvent également dans le datura et la jusquiame.

Les bases volatiles ont une grande importance dans le dosage des alcaloïdes. Nous reviendrons sur ce point ultérieurement.

++++ HYOSCYAMINE ET ATROPINE - RACEMISATION +++++

La comparaison des actions pharmacodynamiques provoquées par l'hyoscyamine et son racémique l'atropine a fait l'objet de nombreux travaux.

Jeanne LEVY (96) a repris les principaux travaux plus ou moins contradictoires antérieurs à 1945 et a pu conclure que si l'hyoscyamine est plus active que l'atropine dans son action antagoniste vis-à-vis de l'acétylcholine sur l'intestin isolé de rat, elle semble avoir la même activité que l'atropine sur un certain nombre d'organes, notamment sur l'oeil énucléé de grenouille.

Il ne semble pas utile de doser séparément les deux alcaloïdes, car d'une part les différences d'action ne sont pas très marquées, et d'autre part - et c'est la raison la plus importante - il y a surtout de l'hyoscyamine dans les plantes fraîches.

Th. EKLER et I. Van NICKERK (50), J. LEVY (96) et de nombreux autres auteurs sont d'accord sur le fait que dans les préparations galéniques récentes, l'alcaloïde présente est l'hyoscyamine. Cependant, si ces préparations sont conservées longtemps et sans précaution, l'hyoscyamine peut se racémiser et se transformer en atropine.

++++ "ALCALOÏDES" VOLATILS +++++

Nous allons essayer de montrer l'importance de ces substances dans les dosages acidimétriques des principes actifs des solanacées mydriatiques.

A. LARSONNEAU, dans un travail effectué sous la direction de E. PERROT et A. GORIS, isola des préparations de belladone des bases volatiles qu'il put caractériser. Il faut souligner dès à présent qu'il s'agit de bases volatiles, donc de corps qui seront dosés avec des alcaloïdes bases, par acidimétrie.

F. BEAUSITE (13) avait été conduit à diviser les méthodes utilisées pour effectuer les titrages des extraits de belladone en deux groupes, selon le traitement de la solution éthéro-chloroformique d'extraction :

Méthodes dans lesquelles on procède à la distillation de ce mélange, et à la dessiccation à l'étuve du résidu alcaloïdique.

Méthodes dans lesquelles les solutions sont reprises directement par un acide titré, sans distillation et dessiccation préalable.

Dans les premières méthodes, les alcaloïdes dosés correspondent aux alcaloïdes fixes. Dans les secondes, les alcaloïdes dosés correspondent aux alcaloïdes totaux, fixes et volatils.

En effet, A. LARSONNEAU (93) après une série d'essais, conclut :

1°- les bases volatiles contenues dans l'extrait de belladone sont entraînées par l'éther, au moins en partie, lorsqu'on effectue un dosage.

2°- La quantité de ces bases qui entre en solution dans l'éther, se trouve dosée en même temps que les alcaloïdes fixes dans les procédés qui recommandent de reprendre directement les liqueurs éthérées par l'acide sulfurique centinormal sans dessiccation préalable.

3°- Les bases volatiles sont bien éliminées au moment de la distillation suivie de dessiccation à l'étuve à 100° qui recommandent certaines pharmacopées. Leur départ explique la diminution que l'on constate dans le taux des alcaloïdes en opérant dans ces conditions."

"Le tétraméthylaminobutane (jusquiame) et la méthylpyrrolidine (belladone) se comportent comme des bases complexes, intervenant dans les dosages d'une façon qui les rapproche beaucoup des alcaloïdes fixes. Ce fait est digne de remarque: si en effet les bases pyrroliques et les diamines n'entrent que pour une faible proportion dans la totalité des alcaloïdes de la belladone, par contre elles interviennent presque quantitativement dans les dosages, et sont exprimées dans le résultat en poids d'atropine, base de poids moléculaire beaucoup plus élevé."

Nous reviendrons plus loin sur l'importance qu'il faut attribuer à ces conclusions.

+++++

+++++ PREPARATIONS OFFICINALES

+++++

Nous avons vu que les trois solanacées mydriatiques inscrites au Codex 1949 étaient la belladone, la jusquiame et le datura. Etudions rapidement les principales préparations inscrites au Codex en indiquant le taux d'alcaloïdes qu'elles doivent renfermer.

++++
++++

BELLADONE

I - POUDRE DE BELLADONE . Les feuilles sont mondées puis séchées à l'étuve à + 40°. On pulvérise sans résidu et on passe au tamis module 22. La belladone doit contenir 0,30 pour cent d'alcaloïdes totaux (exprimés en atropine base) rapportés à la poudre desséchée.

Ce chiffre est "manifestement trop faible et laisse toute latitude à la fraude" (64).

Dans un mémoire présenté en 1945, M. MASCRE et H. GENOT-BOULANGER (102) signalaient que les produits commerciaux ont presque toujours un titre plus élevé. Pour quelques poudres, ils ont trouvé des titres de 0,62 - 0,72 - 0,83 - 0,88 et 1,36 pour cent pour la poudre desséchée à 100°.

Le Codex 1937 indiquait que ce taux de 0,30 était un minimum, ce qui rendait dangereuses de telles poudres qui étaient officinales. Cette précision ne figurant plus à l'édition de 1949, faut-il conclure que la poudre doit être ajustée à ce titre par un procédé analogue à celui adopté par diverses pharmacopées étrangères (britannique ou U.S.P. par exemple)? MASCRE et GENOT-BOULANGER proposaient que la poudre soit préparée avec les feuilles et les tiges de belladone, le titre des tiges étant toujours inférieur à celui des feuilles. La pharmacopée italienne fait ramener au titre par l'amidon de riz.

II - EXTRAIT DE BELLADONE. Préparé à partir de feuilles de belladone en poudre demi-fine, il doit contenir 2,5 g pour cent d'alcaloïdes pour un extrait calculé à 10 pour cent d'eau. Si le titre est supérieur, le Codex prescrit de l'ajuster par addition d'un extrait de titre inférieur, ou à défaut, d'extrait de chiendent

III - TEINTURE DE BELLADONE. Obtenue par lixiviation de poudre de feuilles avec de l'alcool à 70°, il doit contenir 0,03 pour cent d'alcaloïdes totaux. Le Codex 1949 prescrit

d'ajuster si besoin à ce titre. De plus, la provision de teinture doit être renouvelée tous les ans, ce qui limite la racémisation.

++++

DATURA STRAMOINE

++++

I - POUDRE DE DATURA. Elle se prépare de la même façon que la poudre de belladone.

Le dosage des alcaloïdes totaux doit s'effectuer comme pour cette dernière, et la feuille de datura doit titrer 0,30 pour cent d'alcaloïdes totaux.

Il semble qu'il ne s'agisse pas d'un minimum, mais le Codex ne précise pas comment on doit opérer pour ajuster une poudre trop chargée en alcaloïdes.

II - TEINTURE DE DATURA. Elle se prépare et se dose comme celle de belladone.

Le Codex indique un titre de 0,03 pour cent d'alcaloïdes totaux et prescrit d'ajuster si besoin la teinture à ce titre.

++++

JUSQUIAME NOIRE

++++

I - POUDRE DE JUSQUIAME. Elle se prépare et se dose par les mêmes méthodes que la poudre de belladone, mais son titre est plus faible: la feuille de jusquiame doit renfermer 0,20 pour cent d'alcaloïdes.

Le Codex mentionne également une poudre de semences, sans indication de titre, et qui n'est utilisée que pour la préparation des pilules de cynoglosse opiacées.

II - EXTRAIT DE JUSQUIAME. Préparé et dosé comme celui de belladone, le Codex précise de le ramener au titre indiqué suivant le procédé utilisé pour l'extrait de belladone.

Alors que le Codex 1937 prescrivait un titre de 1,50 pour cent pour un extrait à 10 pour cent d'eau, le Codex 1949 a ramené ce titre à 1 pour cent. A. MOREL (105) avait protesté contre ce titre qu'il trouvait trop élevé, n'ayant jamais pu

l'atteindre avec des jusquiames titrant 0,20 à 0,25 pour cent d'alcaloïdes, ses chiffres moyens obtenus pour les extraits s'échelonnant entre 0,16 et 0,84, avec une moyenne de 0,50.

III - TEINTURE DE JUSQUIAME. Elle est préparée et dosée comme celle de belladone. Le Codex indique un titre de 0,02 pour cent d'alcaloïdes totaux et prescrit d'ajuster si besoin la teinture à ce titre.

+++++

+++++

+++++

PROCEDES DE DOSAGE DES PHARMACOPEES FRANCAISE
ET ETRANGERES

Parmi les propriétés générales des alcaloïdes, certaines présentent un intérêt particulier du point de vue analytique et ont été mises à profit pour l'extraction et le dosage de ces principes actifs. Ce sont leur réaction basique et leur solubilité dans les solvants organiques à l'état de bases.

++++

++++

PHARMACOPEE FRANCAISE

Elle utilise le procédé classique de déplacement par un alcali, extraction par un solvant organique et dosage acidimétrique après purification.

Le Codex 1949 a modifié sensiblement la méthode indiquée par l'édition de 1937, surtout en tenant compte des alcaloïdes volatils qui sont maintenant éliminés.

I - CODEX 1937

A)- POUDRE : Le principe est le suivant :

La poudre est humectée avec de l'alcool à 60°. La prise d'essai est de 10 g. Après 2 h. de contact on ajoute un mélange éthéro-chloroformique dans lequel passent en solution les alcaloïdes, déplacés par une solution de carbonate de sodium. Après un certain temps de contact, on filtre en recueillant la solution éthéro-chloroformique d'alcaloïdes-base.

Après réduction du volume de moitié, on agite avec une solution centinormale d'acide sulfurique en excès. On titre l'excès d'acide après séparation, en présence d'iodéosine.

La première critique concerne les alcaloïdes volatils qui ne sont pas éliminés. Le dosage proprement dit des alcaloïdes nous semble soumis à une légère cause d'erreur sur laquelle nous reviendrons au chapitre III.

B)- EXTRAIT : Il se dose comme la poudre, après dissolution dans l'alcool à 60°.

Les méthodes sont identiques pour les trois poudres, les extraits et les teintures des différentes solanacées étudiées.

II - CODEN 1949

A)- POUDRE : Voici la méthode telle qu'elle est décrite à l'article belladone :

Dosage des alcaloïdes totaux. Prélevez sur le lot de feuilles à essayer un échantillon moyen de 50 g environ; pulvériser sans résidu au mortier couvert et passez au tamis couvert module 22.

Déterminez d'une part sur une prise d'essai voisine de 0,50 g le taux d'humidité de la poudre, par dessiccation à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant.

D'autre part, pesez 15 g de poudre, introduisez-les dans un flacon de verre bouchant à l'émeri. Ajoutez 150 cm³ d'un mélange constitué de 90 g d'éther éthylique et de 30 g de chloroforme. Laissez en contact pendant 10 minutes et ajoutez 10 cm³ d'ammoniaque diluée. Agitez fréquemment pendant 2 heures. Filtrerez sur un entonnoir couvert et recueillez 120 cm³ du filtrat correspondant à 12 g de poudre.

Distillez la totalité du liquide puis maintenez le récipient au bain-marie bouillant pendant 20 minutes.

Reprenez le résidu par 50 cm³ du mélange éthéro-chloroformique employé par fractions et recueillez les liqueurs dans une ampoule à décantation. Ajoutez 20 cm³ de solution centinormale d'acide sulfurique. Agitez à plusieurs reprises et laissez reposer. La couche aqueuse doit présenter une réaction acide au tournesol. Dans le cas contraire, ajoutez une nouvelle quantité de solution centinormale d'acide sulfurique dont vous déterminerez le volume et agitez de nouveau. Soutirez la liqueur aqueuse et passez sur un filtre lavé et mouillé, placé sur un flacon de verre bouchant à l'émeri.

Lavez à trois reprises la liqueur éthéro-chloroformique avec chaque fois 10 cm³ d'eau distillée et réunissez les eaux de lavage à la liqueur acide précédente.

La neutralité de l'eau distillée employée, du filtre et du flacon devra au préalable être soigneusement vérifiée.

Ajoutez ensuite à la liqueur acide une quantité d'éther éthylique suffisante pour obtenir une couche surnageante de 1 cm de hauteur. Titrez l'excès d'acide en présence de 5 gouttes de solution d'iodéosine à l'aide de solution centinormale d'hydroxyde de potassium en agittant fortement après chaque addition jusqu'à ce qu'il se développe dans la couche aqueuse séparée par repos une coloration rosée.

Soit N le nombre total de cm³ de solution centinormale d'acide sulfurique employés à l'épuisement de la liqueur éthéro-chloroformique et n le nombre de cm³ de solution centinormale d'hydroxyde de potassium employés pour le titrage final.

1 cm³ de solution centinormale d'acide sulfurique
= 0,002894 g d'atropine.

Teneur pour cent en atropine de la poudre essayée :

$$\frac{(N - n)0,2894}{12}$$

Rapportez cette teneur à la poudre desséchée en tenant compte de l'humidité préalablement déterminée. La feuille de belladone doit contenir 0,30 pour cent d'alcaloïdes totaux exprimés en atropine.

Les poudres de datura et de jusquiame se titrent de la même façon.

La prise d'essai pour la poudre, plus élevée que dans la technique de 1937, augmente la précision des dosages en diminuant l'erreur absolue.

Le mélange éthéro-chloroformique comprend 3/4 d'éther et 1/4 de chloroforme en poids, au lieu de 2/3 et 1/3. Les alcaloïdes ne sont plus déplacés par une solution de carbonate de sodium, mais par de l'ammoniaque diluée. Le temps de contact est doublé, d'où une meilleure extraction.

Enfin, et surtout, les alcaloïdes volatils sont maintenant éliminés.

Le dosage final n'est pas modifié et nous l'étudierons plus loin.

Enfin, le taux de 0,30 pour cent d'alcaloïdes totaux est cette fois rapporté à la poudre desséchée.

B)- EXTRAIT :

Dosage des alcaloïdes : Pesez 3 g d'extrait; introduisez-les dans un flacon de verre bouchant à l'éméri et dissolvez-les dans 10 cm³ d'alcool à 60°. Ajoutez 120 cm³ d'un mélange constitué de 90 g d'éther éthylique, 30 g de chloroforme et 10 g d'ammoniaque diluée. Agitez fréquemment pendant 2 heures. Filtrez sur un entonnoir couvert et recueillez 80 cm³ de filtrat. Poursuivez le dosage comme il a été indiqué pour la belladone.

La quantité d'alcaloïdes trouvée correspond à 2 g d'extrait.

L'extrait de jusquiame se dose de la même façon

C)- TEINTURE :

Exposez dans le vide en présence d'une substance desséchante 100 g de teinture et effectuez sur le résidu, le dosage des alcaloïdes comme il est indiqué à l'article belladone.

Ce procédé s'applique aux teintures de belladone, de datura et de jusquiame.

++++ PHARMACOPÉES ÉTRANGÈRES

Voici les procédés de dosage des principales pharmacopées étrangères

I - PHARMACOPÉE ALLEMANDE : D.A.B.6 (36)

A)- BELLADONE :

1 - Feuilles - Elles doivent contenir au moins 0,3 pour cent d'hyoscyamine.

Les alcaloïdes de 10 g de poudre sont extraits par l'éther en présence d'ammoniaque. La solution étherée, clarifiée par addition de talc, est concentrée au tiers par distillation. Le résidu est extrait par un excès d'acide 0,1 N et on titre par la potasse en présence de rouge de méthyle.

2 - Extrait sec - Titre 1,48 à 1,52 pour cent en hyoscyamine. Ramener au titre par addition de dextrine.



Après dissolution dans un peu d'eau, on extrait les alcaloïdes par l'éther en présence d'ammoniaque. L'éther est clarifié par la gomme adragante, évaporé jusqu'à disparition d'odeur éthérée, et le résidu est dosé par acidimétrie en retour après dissolution dans l'alcool.

B)- JUSQUIAME :

1 - Feuilles - Elles doivent contenir au moins 0,07 pour cent en hyoscyamine et se titrent comme la belladone.

2 - Extrait sec - Titre 0,47 à 0,55 pour cent en hyoscyamine. Ramener au titre par addition de dextrine.

Se dose comme l'extrait de belladone.

On a reproché à la méthode du DAB 6 de ne pas enlever toutes les bases volatiles, le dosage final se trouvant ainsi entaché d'une erreur par excès.

H. ÖHBLOM (110) indique que par la méthode officielle danoise - qui est la même que l'allemande - les résultats obtenus pour la poudre peuvent être de cent pour cent trop élevés. Avec les teintures de belladone et datura, les résultats sont satisfaisants si le traitement de la solution éthérée par la gomme adragante est supprimé.

K. KACZVINSZKI (83) signale deux améliorations possibles: les unes portent sur la filtration, les autres sur l'évaporation de la solution éthérée finale qu'on peut poursuivre plus longtemps, jusqu'à disparition de l'odeur de bases pyridiniques.

K. NAEGELI et H. SEELING (108) reprenant les travaux de PEYER et GSTIRNER (résidu laissé 2 heures au bain-marie avant le dosage) et de PROCKE et SEIDL (enlèvement des bases volatiles par agitation d'une solution benzolique d'alcaloïdes avec de la soude) concluent de leurs expériences que la reprise de l'extrait final par du benzol donne des résultats plus faibles que la méthode officielle et comparables à ceux obtenus par le procédé suisse. Ils proposent donc cette amélioration pour le prochain DAB.

F. GSTIRNER et G. STEIN (67) prouvent que l'erreur en excès qui entache les résultats obtenus par la méthode du DAB correspond exactement aux bases non alcaloïdiques. Un traitement par le chloroforme de la solution acide alcaloïdique suffirait à les enlever. La méthode serait satisfaisante et d'exécution plus rapide que les procédés britannique et suisse.

II - PHARMACOPEE BELGE : Ier sup. 1940 (113)A)- BELLADONE :

I - Feuilles - La poudre de feuilles, desséchée à 50° doit titrer 0,30 pour cent exactement en alcaloïdes totaux.

Les alcaloïdes de 10 g de poudre sont extraits par l'éther en présence d'ammoniaque. La solution étherée est clarifiée par du talc et les alcaloïdes sont extraits par un mélange d'acide chlorhydrique 0,1 N et d'alcool. On purifie par lavage avec du chloroforme (lui même lavé par de l'acide) et les liqueurs acides alcalinisées sont traitées par du chloroforme. Le résidu de l'évaporation est titré par acidimétrie en retour, en présence de rouge de méthyle.

2 - Extrait sec - Préparé à une température inférieure à 50°, il titre 1,50 pour cent en alcaloïdes totaux. Ramené au titre par du lactose.

On traite 2 g d'extrait (dissout dans un peu d'eau et alcalinisé par de l'ammoniaque), par de l'éther qui est ensuite clarifié par la gomme adragante. La solution est alors traitée comme pour la poudre.

3 - Teinture - Titre 0,03 pour cent en alcaloïdes totaux.

80 g réduits à 10 g sont additionnés de 10 g d'eau, puis filtrés. Le filtrat, alcalinisé par l'ammoniaque, est traité par l'éther qui, après clarification par la gomme adragante, est traité par l'acide comme pour la poudre.

B)- JUSQUIAME :

I - Feuilles - Titre 0,05 pour cent en alcaloïdes totaux.

40 g de poudre, alcalinisés par l'ammoniaque, sont mis en contact 1 heure avec un mélange alcool-éther, puis épuisés dans un percolateur par ce mélange, puis par l'éther seul, jusqu'à extraction totale. Après évaporation, le résidu est repris par l'éther, puis traité par l'acide comme pour la poudre de belladone.

2 - Extrait sec - Titre 0,3 pour cent d'alcaloïdes totaux.

8 g d'extrait, dissous dans un peu d'eau, sont traités par l'éther en présence d'ammoniaque. Après clarification par la gomme adragante, l'éther est traité par l'acide comme dans le cas de la poudre de belladone.

III - PHARMACOPEE BRITANNIQUE : B.P. 1953 (22)

A)- BELLADONE : La poudre de feuilles de belladone, qui ne doit pas contenir moins de 0,30 pour cent d'alcaloïdes, calculés en hyoscyamine, sert à l'obtention d'une poudre "préparée" - ajustée exactement au titre de 0,30 pour cent au moyen d'une autre poudre de belladone de titre convenable - un extrait sec à 1 pour cent d'alcaloïdes et une teinture à 0,03 pour cent.

La racine de belladone (qui ne doit pas contenir moins de 0,40 pour cent d'alcaloïdes) est également utilisée pour préparer un extrait fluide titrant 0,75 pour cent d'alcaloïdes.

I - Poudre - 10 g de poudre fine sont laissés 10 minutes en contact avec un mélange d'éther-alcool, puis, après contact d'une heure avec une solution d'ammoniaque, épuisés dans un percolateur avec le mélange éther-alcool puis l'éther seul; le temps total de la percolation ne doit pas dépasser 3 heures. Le percolat réduit à 20 cm³ est additionné de chloroforme et les alcaloïdes sont mis en solution aqueuse acide. La solution acide est lavée par du chloroforme (lui-même lavé par de l'acide) et les solutions acides réunies, alcalinisées nettement par l'ammoniaque sont agitées avec du chloroforme jusqu'à complète extraction des alcaloïdes.

Le chloroforme est lavé, évaporé complètement et le résidu, repris par 2 cm³ d'alcool absolu, est séché à 100° jusqu'à poids constant, dissout dans un excès d'acide titré et dosé par la soude en présence de rouge de méthyle.

2 - Extrait sec - 3 g d'extrait agités 30 minutes avec un mélange d'alcool à 95° et d'eau et alcalinisés par l'ammoniaque sont traités par le chloroforme qui extrait les alcaloïdes.

On les fait passer en solution acide et on continue comme pour la poudre.

3 - Teinture - 100 g de teinture, évaporés à 10 cm³, sont alcalinisés par l'ammoniaque et traités par le chloroforme. On continue comme ci-dessus.

La racine de belladone se dose comme les feuilles.

B)- JUSQUIAME : Ne contient pas moins de 0,05 pour cent d'alcaloïdes calculés en hyoscyamine.

Leur dosage se fait comme pour la poudre de belladone (sur 40 g).

1 - Extrait sec - Titre 0,27 à 0,33 pour cent d'alcaloïdes.

Après extraction par percolation avec de l'alcool chaud, la solution alcaloïdique concentrée est traitée comme l'extrait fluide ci-dessous.

2 - Extrait fluide - Titre 0,05 pour cent d'alcaloïdes.

Les alcaloïdes de 50 cm³ (évaporés à 15 cm³) sont extraits par le chloroforme en présence d'ammoniaque. On continue comme pour la poudre de belladone, mais le résidu alcaloïdique final est séché seulement 2 heures à 80°.

3 - Teinture - Titre 0,005 pour cent d'alcaloïdes.

250 cm³ de teinture, réduits à 10 cm³, sont traités comme l'extrait fluide.

C)- DATURA : Les feuilles qui ne contiennent pas moins de 0,90 pour cent d'alcaloïdes exprimés en hyoscyamine, servent à préparer un extrait sec (0,90 à 1,10 pour cent d'alcaloïdes), un extrait fluide (0,225 à 0,275 pour cent d'alcaloïdes) et une teinture contenant 0,025 pour cent d'alcaloïdes.

Toutes ces préparations se titrent comme les produits correspondants de belladone.

L'étude de C.E. CORFIELD, E.W. KASSNER et E. COLLINS (3) met en valeur le procédé britannique pour l'élimination des alcaloïdes volatils, même dans le cas de Indian Belladonna, qui contient une grande quantité de ces corps.

La PHARMACOPEE INTERNATIONALE (116) a adopté ce procédé en donnant toutefois le choix entre un dosage final identique à celui de la B.P. et un dosage par la soude, en présence de phtaléine, sur la reprise par l'eau d'un résidu d'évaporation à sec d'une solution d'alcaloïdes dans le chloroforme et l'iso-propanol.

IV - PHARMACOPEE DES ETATS-UNIS : U.S.P. XIV (114)

Seule la belladone figure dans cette édition. Jusquiame et stramoine étaient inscrites à l'édition XIII.

Le dosage de la poudre de feuilles de belladone - qui doit contenir au moins 0,35 pour cent d'alcaloïdes- s'effectue par épuisement au soxhlet par l'alcool-éther en présence d'ammoniaque après contact d'une nuit. La solution d'alcaloïdes obtenue est épuisée par un acide, reprise par le chloroforme, évaporée et reprise 3 fois par le chloroforme, puis dosée acidimétriquement en présence de rouge de méthyle. (L'épuisement au soxhlet peut également se faire par l'éther-chloroforme.)

FORMULAIRE NATIONAL N.F. VIII (109)

A)- BELLADONE : Ici encore figurent les racines et un extrait fluide de racine.

I - Extrait fluide de feuilles - Doit contenir 0,30 pour cent d'alcaloïdes. (0,27 à 0,33).

10 cm³ d'extrait fluide sont évaporés sur bain-marie, puis on extrait les alcaloïdes par le chloroforme, en présence d'ammoniaque diluée. On fait alors passer les alcaloïdes en solution sulfurique diluée, et on les extrait à nouveau par le chloroforme en milieu ammoniacal.

Le chloroforme est évaporé à sec et laissé 15 minutes au bain-marie, puis repris par le chloroforme, évaporé à sec et chauffé 15 minutes deux fois de suite. On titre le résidu alcaloïdique par acidimétrie en retour en présence de rouge de méthyle.

B)- JUSQUIAME : Les feuilles servent à préparer un extrait à consistance pilulaire (0,135 à 0,175 pour cent d'alcaloïdes), un extrait sec (0,155 pour cent d'alcaloïdes) et un extrait fluide (0,040 pour cent d'alcaloïdes). Ces trois extraits se titrent comme l'extrait fluide de belladone.

C)- DATURA : Sert à préparer des capsules (0,238 à 0,288 pour cent d'alcaloïdes) qui se dosent comme la racine de belladone, et un extrait fluide (0,22 à 0,28 pour cent d'alcaloïdes) qui se dose comme l'extrait fluide de feuilles de belladone.

H.V. GILLILAND, K.L. KAUFMAN et H. BANG (60) signalent que dans le dosage d'extrait pulvérisé, la macération initiale d'une nuit dans un mélange alcool-éther-ammoniaque, suivie d'une extraction à l'éther (méthode U.S.P. XI second sup.) est supérieure à la digestion initiale de l'extrait dans l'acide sulfurique dilué et le chloroforme.

V - PHARMACOPEE HELVETIQUE : 1949 (115)

A)- BELLADONE : FEUILLES : Contiennent au moins 0,3 pour cent d'alcaloïdes.

On fait macérer une heure 10 g de feuilles dans de l'alcool qui est filtré puis évaporé. Les alcaloïdes sont alors mis en solution acide, puis repris par l'éther qui est clarifié par la gomme adragante. Le résidu d'évaporation est repris par l'alcool, évaporé à nouveau, puis titré par un acide en présence de rouge de méthyle.

1 - Extrait sec - Exempt de chlorophylle, il titre 0,45 à 0,55 pour cent d'alcaloïdes.

Les alcaloïdes sont extraits par l'éther en présence d'ammoniaque. On continue comme pour la poudre.

2 - Teinture - Préparée à partir de l'extrait, elle titre 0,045 à 0,055 pour cent d'alcaloïdes, qui sont dosés comme dans l'extrait après évaporation.

RACINES : Renferment au moins 0,45 pour cent d'alcaloïdes.

B)- JUSQUIAME : Les feuilles servent à préparer un extrait sec (0,45 à 0,55 pour cent d'alcaloïdes) et une teinture (0,045 à 0,055 pour cent d'alcaloïdes) qui se titrent comme la belladone.

C)- DATURA : Les feuilles, qui doivent renfermer au moins 0,2 pour cent d'alcaloïdes, servent à préparer une teinture renfermant 0,045 à 0,055 pour cent d'alcaloïdes. Celle-ci se dose comme celle de belladone mais le résidu étheré est repris deux fois par l'éther avant le titrage final. Signalons également l'utilisation des semences.

VI - PHARMACOPEE ITALIENNE : 1950 (51)

A)- BELLADONE : Les feuilles qui titrent 0,3 pour cent d'alcaloïdes (ramenées au titre par l'amidon de riz) et les racines qui ne doivent pas contenir moins de 0,45 pour cent d'alcaloïdes se dosent de la même façon.

Les alcaloïdes sont extraits de 12 g de produit par l'éther et le chloroforme en présence d'ammoniaque. Après passage en solution acide et reprise par l'éther-chloroforme, on évapore et le résidu est titré acidimétriquement en présence d'hématoxyline.

1 - Extrait hydroalcoolique - Doit contenir 1,30 pour cent d'alcaloïdes.

Les alcaloïdes de 3 g d'extrait sont enlevés par l'éther en présence d'ammoniaque, et le résidu est repris 3 fois par l'éther après évaporation. On termine acidimétriquement en présence d'hématoxyline.

2 - Teinture - Doit contenir 0,03 pour cent d'alcaloïdes qui sont dosés comme pour l'extrait.

3 - Extrait sec - Titre 1 pour cent d'alcaloïdes.

B)- JUSQUIAME : Les feuilles, pour lesquelles il n'est pas indiqué de dosage, servent à préparer un extrait mou et une teinture qui se dosent comme la belladone.

++++
++++ COMPARAISON RAPIDE ENTRE LES DIFFERENTES PHARMACOPÉES

Nous nous limitons aux procédés indiqués pour la poudre de belladone, en ce qui concerne l'extraction des alcaloïdes totaux.

I - EXTRACTION DES ALCALOÏDES TOTAUX

Pharmacopée FRANÇAISE :

Par l'éther-chloroforme en milieu ammoniacal.

Pharmacopée ALLEMANDE :

Par l'éther en milieu ammoniacal.

Pharmacopée BELGE :

Par l'éther en milieu ammoniacal

Pharmacopée BRITANNIQUE :

Percolation de 3 heures par l'éther-alcool, puis l'éther seul, en milieu ammoniacal.

Pharmacopée des ETATS-UNIS :

Au soxhlet pendant 3 heures, par l'alcool-éther ou l'éther-chloroforme après contact d'une nuit.

Pharmacopée HELVÉTIQUE :

Par l'éther en milieu ammoniacal, après macération dans l'alcool.

Pharmacopée ITALIENNE :

Par l'éther-chloroforme en milieu ammoniacal.

II - PURIFICATIONS

Très nombreuses en Angleterre, moins nombreuses en France, Belgique, Etats-Unis et Suisse, absentes en Allemagne et Italie.

III - ELIMINATION DES BASES VOLATILES

Pharmacopée FRANÇAISE :

Résidu étheré laissé 20 minutes au bain-marie bouillant.

Pharmacopée ALLEMANDE :

Résidu étheré évaporé jusqu'à disparition de l'odeur étherée (pour l'extrait seulement).

Pharmacopée BELGE :

Résidu étheré évaporé.

Pharmacopée BRITANNIQUE :

Résidu d'évaporation chloroformique, repris par l'alcool absolu est évaporé à sec et séché à 100° jusqu'à poids constant.

Pharmacopée des ETATS-UNIS :

Trois reprises successives par le chloroforme évaporé chaque fois et chauffé 15 minutes.

Pharmacopée HELVETIQUE :

Résidu étheré repris par l'alcool et évaporé à nouveau.

Pharmacopée ITALIENNE :

Résidu étheré repris 3 fois par l'éther qui est évaporé chaque fois (pour l'extrait).

C H A P I T R E I I

-:-:-

METHODES NON OFFICIELLES DE DOSAGE

De nombreux procédés de dosage ont été proposés ces dernières années. Nous laisserons volontairement de côté les méthodes générales de dosage des alcaloïdes et leur application aux dosages des alcaloïdes des solanacées.

Nous retiendrons seulement :

- les méthodes ayant apporté des modifications aux procédés officiels.
- les méthodes spécifiques des alcaloïdes considérés.
- les méthodes utilisant la chromatographie.

Une énumération chronologique des diverses méthodes serait fastidieuse et ne permettrait pas une étude comparative. Nous avons préféré les examiner sous leur trois aspects:

- extraction et purification des alcaloïdes
- dosage proprement dit
- séparation entre atropine-hyoscyamine et scopolamine.

+++++
+++++
+++++

EXTRACTION ET PURIFICATION DES ALCALOIDES

Les travaux publiés ces dernières années sont très nombreux et nous allons rapidement passer les principaux en revue.

++++
++++

METHODES VOISINES DE CELLE DU CODEX

Elles sont peu nombreuses, la majorité des auteurs faisant appel à la chromatographie pour purifier les alcaloïdes.

Diverses améliorations ont été proposées :

Une macération de la plante avec une solution tampon citrique de pH 3 qui n'entraîne pas de pigments, de telle sorte que l'extraction ultérieure avec le benzène et l'ammoniaque est pratiquement incolore (J.A. WITT, V. JIRAWONGSE, H.W. YOUNGKEN - (144))

La plante est épuisée par le benzène en présence d'ammoniaque. Le passage de la solution sur une colonne de saccharose retient la presque totalité de la chlorophylle (W.C. FULLER, M.R. GIBSON - (57)).

Revenant sur la méthode plus ancienne de HEGNAUER et FLÜCK, DIJKSTRA (37) préconise à nouveau en 1951 la macération de la poudre dans de l'eau acidulée par l'acide sulfurique avant de procéder à l'extraction étherée en milieu ammoniacal. La méthode est rapide mais les alcaloïdes volatils sont dosés. (Il serait évidemment aisé d'améliorer le titrage final par un des procédés d'élimination de ces bases).

L'extraction des alcaloïdes est améliorée si la percolation se fait en présence d'agents mouillants non ioniques (W.J. BUTLER, G.A. WIESS - (26)).

Une autre amélioration technique pourrait permettre une extraction plus satisfaisante des alcaloïdes, grâce à l'emploi de certains appareils, comme celui qui a permis de substituer aux heures nécessaires à la préparation d'une teinture, quelques minutes seulement (DEAN et collaborateurs - (32)).

++++
++++

METHODES UTILISANT L'ALUMINE

Nous nous limiterons aux principales techniques.

C.W. BROWNLEE (24) a essayé en 1945 de pratiquer une

chromatographie sur alumine des produits galéniques eux-mêmes. Les bandes obtenues sont ensuite séparées et éluées. Mais la méthode est difficilement applicable quand les substances extractives sont abondantes et la teneur en alcaloïdes faible.

M. ROBERTS et W.O. JAMES (123) en 1947, commencent par une extraction benzénique des alcaloïdes en présence d'ammoniaque (le benzène entraînant moins de pigments que le chloroforme ou un mélange alcool-éther). Il est nécessaire d'opérer par percolation, et elle dure 2 à 4 heures, la prise d'essai n'étant pourtant que de 1 g de poudre.

La purification des alcaloïdes se fait par adsorption d'abord sur colonne d'alumine, puis sur colonne de silice. Le chloroforme sert d'éluant.

Le dosage exige six heures. La précision est de 2 pour cent. Le dosage acidimétrique (microtitration) peut être contrôlé par colorimétrie (réaction de VITALI-MORIN).

La méthode de N.G. BROWN, E.R. KIRCH, G.L. WEBSTER (23) en 1948, ne comprend qu'une purification sur colonne d'alumine activée, et l'éluution se fait par l'alcool éthylique et le dosage par acidimétrie. Les résultats obtenus sont supérieurs à ceux obtenus par la méthode U.S.P. et s'expliquent, suivant les auteurs, par la simplicité de la méthode qui évite des pertes d'alcaloïdes.

En 1950, M. RUBIN et L.E. HARRIS (128) préconisent une méthode assez voisine, mais la prise d'essai est de 10 g de poudre. Après macération d'une heure en présence d'éther et d'ammoniaque, ils pratiquent également l'adsorption sur alumine et l'éluution alcoolique. Mais avant le dosage acidimétrique, ils chauffent l'éluat, déjà évaporé à sec, pendant 15 minutes supplémentaires, se mettant ainsi à l'abri d'une erreur due à la présence de bases volatiles.

++++
++++

METHODES UTILISANT D'AUTRES ADSORBANTS

En 1951, G. SCHILL et A. ÅGREN (131) ont utilisé une partition chromatographique dans laquelle la phase immobile est une solution tampon retenue par un kieselguhr de qualité convenable. La préparation à étudier (poudre ou extrait) est placée sur la colonne en présence d'une solution de carbonate de sodium, et l'élution se fait par le chloroforme. L'éluat est alors purifié par passage sur un kieselguhr supportant un tampon acide, puis sur une couche d'alumine. Le dosage final se fait après évaporation à sec, par polarimétrie et acidimétrie.

Signalons l'étude de E.K. JOHNSON et L.W. RISING (82) sur l'adsorption de l'atropine par différentes substances: talc, kaolin, gel de silice, crème d'alumine et charbon activé. Cette adsorption qui est indépendante du pH est très marquée pour le charbon, un peu moins pour le gel de silice, et plus faible pour les autres adsorbants essayés.

++++
++++

PROCEDES UTILISANT LES RESINES ECHANGEUSES D'IONS

Voici la technique décrite par A. JINDRA (80) pour la poudre de belladone: 2 g de poudre sont extraits par l'éther en présence d'ammoniaque diluée. Une partie de l'éther est évaporée, reprise par 2 cm³ d'alcool et évaporée à nouveau. Le résidu alcaloïdique impur est repris par l'acide sulfurique dilué. La solution de sel d'alcaloïdes est passée sur colonne d'Amberlite IR.4 B après addition d'un égal volume d'alcool. L'éluat, dilué par de l'eau, est titré par potentiométrie.

La solution aqueuse acide de l'extrait ou du résidu d'évaporation de la teinture est traitée de la même manière que la poudre.

C.O. BJÖRLING et A. BERGGREN (18) après avoir noté qu'il est très difficile de faire une élution quantitative avec les résines échangeuses d'ions, ainsi que le signalaient déjà APPLEZWEIG en 1944 (8) et SAUNDERS et SRIVASTAVA (130) en 1952,

ont proposé en 1953 de purifier les alcaloïdes, avant leur titrage par spectrophotométrie, par passage sur DECALSO F., silicate synthétique du type permutite qui peut être obtenu avec une qualité bien uniforme.

L'alcaloïde se trouve en solution étherée ou aqueuse, et l'élution de l'alcaloïde retenu sur la colonne s'obtient par un acide dilué. Le dosage peut se faire avec 15 mg ou 1,5 mg d'alcaloïdes.

++++
++++

AUTRES METHODES

En 1948, F. REIMERS (119) signale que le dosage des alcaloïdes des solanacées comporte quelques difficultés, dont les plus importantes sont: l'influence des bases volatiles, qui peuvent être extraites et titrées avec les alcaloïdes, et le risque d'une hydrolyse partielle des alcaloïdes lors de l'extraction et de l'évaporation de l'extrait (une molécule d'hyoscyamine donnant une molécule de tropanol et une molécule d'acide tropique). Dans la plupart des cas, toutes les bases non volatiles sont dosées, y compris la tropine inactive si elle se trouve dans la préparation. Ce risque n'est pas très grand, d'après KLAN (88), mais il peut par contre y avoir hydrolyse avec libération de tropine lors de l'évaporation, pour l'extrait, ainsi que l'ont montré notamment ANDERSEN (6) en 1943 et TØNNESEN en 1947 (134).

F. REIMERS cherche à éviter tous ces inconvénients en dosant l'acide tropique obtenu par hydrolyse complète, ce qui équivaut à la somme hyoscyamine, atropine et scopolamine.

Voici le principe de sa méthode :

Les alcaloïdes sont extraits de la drogue ou de l'extrait par l'éther après déplacement par une base faible, et débarrassés de la chlorophylle en les faisant passer en solution aqueuse acide sous forme de sels.

L'extrait acide est alcalinisé par la soude et chauffé au bain-marie jusqu'à hydrolyse totale des alcaloïdes, puis l'acide tropique est extrait par un mélange d'alcool isopropylique et de chloroforme, après acidification du milieu.

Le résidu desséché est évaporé, puis titré par la soude 0,1 N en présence de phtaléine, après dissolution dans un peu d'eau chaude.

L'auteur note que les résultats obtenus avec les alcaloïdes purs sont fidèles. Mais dans le dosage de l'extrait de belladone, il trouve un résultat moitié plus faible que par la méthode officielle danoise, ce qu'il attribue à la présence dans l'extrait de tropine inactive formée par hydrolyse de l'hyoscyamine et de l'atropine durant la préparation de l'extrait et dosée comme un alcaloïde par les autres méthodes.

En 1952, A. ROMEIKE (125) propose de doser les alcaloïdes sous forme de silicomolybdates.

+++++
+++++
+++++

PROCEDES DE SEPARATION HYOSCYAMINE-SCOPOLAMINE

Le problème de la séparation des alcaloïdes est difficile à résoudre. Les premiers travaux datent de 1938 avec KUHN et SCHÄFER (91) qui ont isolé la scopolamine, en utilisant la propriété de la scopolamine d'être une base plus faible et plus soluble dans l'éther que l'hyoscyamine ou l'atropine.

La solution acide des alcaloïdes est rendue facilement alcaline par du bicarbonate de sodium et extraite par l'éther qui enlève, d'après les auteurs, la totalité de la scopolamine et des traces d'hyoscyamine et d'atropine. Pour enlever ces traces on reprend ces corps par un acide dilué après évaporation de l'éther, et on refait des extractions étherées.

Des solutions aqueuses rendues fortement alcalines par l'ammoniaque, on retire atropine et hyoscyamine par le chloroforme. L'hyoscyamine est dosée par son pouvoir rotatoire et les deux alcaloïdes par titration. Les auteurs signalent qu'il n'y a pas de racémisation quand la solution chloroformique de (1)hyoscyamine est évaporée à sec et séchée à 100° pendant 30 minutes dans un four à air, ou chauffée au bain-marie bouillant dans un courant d'air pendant 30 minutes.

Il faut attendre 1944 pour voir ces travaux repris par J.M. ROWSON (126). Ses essais de séparation quantitative scopolamine- atropine par dissolution fractionnée de l'un des composants ne lui ayant donné que des résultats négatifs, J.M. ROWSON propose le procédé suivant :

Les alcaloïdes totaux sont extraits de leur solution par le chloroforme après déplacement par l'ammoniaque, et le solvant est évaporé et séché 50 minutes au bain-marie bouillant aéré. On prend alors le pouvoir rotatoire qui donne scopolamine et hyoscyamine (car on note une légère racémisation accompagnée d'une légère hydrolyse si on élimine d'abord la scopolamine).

On titre les alcaloïdes totaux sur une portion par acidimétrie, et on ajoute l'équivalent exact en bicarbonate de sodium. L'extraction par le chloroforme donne la scopolamine après évaporation et titrage. On en déduit le taux de chaque alcaloïde.

Cette méthode appliquée au dosage des solanacées lui a montré que l'hyoscyamine s'y trouve à un taux élevé, et n'est pas racémisée si on prend certaines précautions lors du séchage des feuilles. A l'occasion de ces dosages, J.M. ROWSON rappelle que la scopolamine est présente dans toutes les solanacées, y compris la belladone.

En 1948, N. TRAUTNER et M. ROBERTS (138) ainsi que TRAUTNER, NEUFIELD et RODWELL (137) décrivent deux procédés de séparation. Scopolamine et hyoscyamine en solution benzénique sont fortement adsorbées sur la silice, et, par élution avec l'alcool absolu, la scopolamine est rapidement entraînée, alors que l'hyoscyamine ne l'est que lentement. Il est possible de détecter les alcaloïdes sur la colonne par une trace de diméthylaminoazobenzol ajouté au benzène, et l'exactitude des résultats dépend de la dimension de la colonne et du rapport scopolamine/hyoscyamine. Les fractions obtenues sont assez pures pour donner des picrates cristallisés, même avec 1 ou 2 mg d'alcaloïdes, ce qui permet une précipitation fractionnée.

A la même époque, W.C. EVANS et M.W. PARTRIDGE (47) ont étudié l'influence, sur la séparation des alcaloïdes, du pH de la phase immobile tamponnée, du chargement de la colonne en alcaloïdes et de la proportion des divers alcaloïdes.

Ils proposent d'extraire les alcaloïdes par le procédé de la pharmacopée britannique, puis de faire passer la solution étherée goutte à goutte sur une colonne de kieselguhr purifié contenant le tampon phosphate M/2. On développe le chromatogramme par l'éther, et on dose chaque fraction d'éluat par acidimétrie avec le vert de bromocrésol.

Quand un alcaloïde est retenu sur la colonne, on continue l'élution par du chloroforme saturé de tampon. Pour la caractérisation des alcaloïdes isolés, les auteurs préfèrent la précipitation sous forme de sels de Reinecke à la précipitation des picrates ou des chloraurates.

Les meilleurs résultats, d'après les courbes de titration publiées par les auteurs, sont obtenues pour un pH de 6,2 à 7,4 suivant le cas. L'étude de ces courbes laisserait penser que les fractions obtenues sont en étroite dépendance avec les conditions de l'expérience: de nombreux facteurs interviennent, et une faible variation de l'un d'eux entraîne de grosses variations. Il faudrait presque connaître à l'avance la composition de l'extrait alcaloïdique, pour obtenir de bons résultats.

Les auteurs concluent pourtant que "la séparation des alcaloïdes par partition chromatographique est une méthode simple d'isolement à partir de quantités relativement faibles de drogue. Avec de petites modifications, on pourrait obtenir une méthode quantitative simple de dosage des alcaloïdes."

W.C. EVANS et M.W. PARTRIDGE ont repris leurs travaux en 1949 (48) et 1952 (49) et ils ont proposé une modification à leur méthode: il est nécessaire de faire une première élution avec du tétrachlorure de carbone pour éliminer les matières colorantes, une deuxième à l'éther pour obtenir la scopolamine et une troisième avec du chloroforme pour entraîner l'hyoscyamine.

La qualité du kieselguhr est très importante et seul le kieselguhr "Hyflo Super-cel" conviendrait.

Enfin en 1952, G.SCHILL et A.ÅGREN (132) ont également proposé une technique de séparation. Il faut environ 150 mg d'alcaloïdes au départ (ce qui correspond à 50 g de poudre environ pour la belladone). La préparation est rendue alcaline par du carbonate de sodium et extraite par percolation avec 200 cm³ de chloroforme. L'éluat est passé sur trois colonnes de kieselguhr: la première qui contient de l'acide chlorhydrique, retient la scopolamine. L'éluat chloroformique est passé sur une deuxième colonne qui contient du carbonate de sodium -qui transforme le chlorhydrate d'hyoscyamine en base-. L'éluat chloroformique est alors passé sur la troisième colonne -qui contient de l'acide phosphorique 0,5 M- qui retient l'hyoscyamine.

On enlève la scopolamine de la première colonne par du chloroforme saturé d'ammoniaque, et on la purifie par passage sur alumine. On obtient de même l'hyoscyamine à partir de la troisième colonne.

Bien qu'ayant laissé volontairement de côté la chromatographie sur papier, nous ne pouvons passer sous silence la séparation aisée des alcaloïdes des solanacées par cette méthode (K.JENTSCH en 1952 -79- et H.BRINDLE, J.E.CARLESS et H.B. WOODHEAD en 1951 -21) d'autant plus que nous devons la première séparation de ces alcaloïdes à MUNIER et MACHEBOEUF (107) qui ont été également les premiers à utiliser la chromatographie sur papier pour l'étude des alcaloïdes.

+++++
+++++
+++++

TITRATION DES ALCALOÏDES

Les différentes méthodes proposées pour le titrage des alcaloïdes peuvent se classer en quatre catégories :

- volumétrie
- colorimétrie
- polarographie, potentiométrie et polarimétrie
- essai biologique

Le dosage gravimétrique, signalé par certains auteurs, s'applique difficilement ici, en raison de la faible teneur en alcaloïdes.

++++
++++ TITRATION PAR VOLUMETRIE

Comme pour la noix vomique, nous n'indiquerons que le dosage acidimétrique, qui est le procédé officiel. Les alcaloïdes isolés sous forme de "bases" peuvent être titrés par un acide en présence d'un indicateur convenable. Le dosage a lieu directement ou en retour, l'excès d'acide étant titré par une base.

L'indicateur est l'iodéosine (Codex) le vert de bromocrésol en milieu tampon pH 4,4 (EVANS et PARTRIDGE), le rouge de méthyle seul (GRAF) ou associé au bleu de méthylène (JINDRA), le bleu de bromophénol (REIMERS).

Ces divers indicateurs ne virant pas pour un même pH, les résultats ne seront pas comparables. Il faudrait étalonner son acide avec l'indicateur utilisé au moyen d'un alcaloïde base, afin de déterminer le coefficient à utiliser.

++++
++++ TITRATION PAR COLORIMETRIE

Les alcaloïdes des solanacées donnent la réaction caractéristique de VITALI.

Après avoir ajouté quelques gouttes d'acide nitrique fumant à l'alcaloïde, et évaporé à sec, on ajoute une goutte de solution de potasse au résidu jaune obtenu. Il se produit alors une coloration jaune violet magnifique mais fugace.

MORIN (106) a proposé en 1936 de dissoudre le résidu dans quelques cm³ d'acétone et d'ajouter la potasse alcoolique à la solution acétonique, ce qui stabilise la réaction colorée.

Cette réaction très sensible, puisqu'elle réussit avec 1/1.000 mg d'atropine, a été appliquée après modification, à un dosage colorimétrique.

W.O JAMES et M. ROBERTS (76) ont montré qu'elle se produit avec tous les esters des acides tropiques et isatropiques a et b, (atropine, hyoscyamine, scopolamine), avec les alcaloïdes

dérivés de l'acide atropique (apoatropine) et même avec les esters de l'acide phényléthylacétique. Mais elle ne se produit pas avec l'acide tropique et le tropanol séparés, ni avec les esters tropanoliques des acides benzoïque, cinnamique ou phénylglycolique (homatropine). Cette réaction colorée est donc assez spécifique, et évite les causes d'erreurs dues aux bases volatiles, aux sels ammoniacaux, au tropanol libre, ce qui explique son succès et le nombre d'auteurs qui l'ont étudiée et appliquée.

En 1939, ALLPORT et WILSON (5) appliquent cette réaction aux acétates d'alcaloïdes obtenus par extraction chloroformique et agitation avec de l'acide acétique dilué. En 1942, N.L. ALLPORT et N.R. JONES (4) reprennent cette réaction pour essayer de supprimer le passage dans l'acide acétique et appliquer cette réaction à l'atropine base, mais sans succès.

En 1952, H.G. ASHLEY (9) propose de remplacer l'acétone par la pyridine dans le procédé de ALLPORT et WILSON.

En 1946, O. ERVENIUS et H. LINDQVIST (45) utilisaient une réaction de VITALI dans l'acétone additionnée de deux pour cent d'alcool absolu. La potasse est en solution méthylique et la lecture se fait à 574 m μ .

Voici les détails de la technique de M. ROBERTS et W.O. JAMES (123)

Pour des quantités d'atropine de l'ordre de 0,02 à 0,16 mg, le résidu alcaloïdique sec est traité avec 0,2 cm³ d'acide nitrique fumant, évaporé à sec, puis, après dissolution dans 10 cm³ d'acétone, on ajoute 0,1 cm³ d'une solution de potasse à 3 pour cent dans l'alcool méthylique. On examine au spectrophotomètre en lumière verte.

A. BRUNZELL, T. CANBACK et H. SEYDLITZ (25) appliquent en 1947 la réaction au dérivé méthylé de l'acide tropique.

Quoiqu'il s'agisse d'une méthode générale de dosage des alcaloïdes, nous citerons le dosage colorimétrique au moyen des reineckates. En 1950, F.J. BANDELIN (11) propose cette méthode pour l'atropine et la scopolamine: On ajoute à la solution

sulfurique d'alcaloïdes, un excès de solution de reineckate d'ammonium. Le précipité est recueilli et dissous dans l'acétone, et la solution est examinée à 525 mμ

Le sel de Reinecke est violet, sa solution saturée également, et le précipité qui entraîne d'autant plus de sel de Reinecke qu'il y a plus d'alcaloïde présente donc une coloration rose violacée proportionnelle à la quantité d'alcaloïde, qui doit être comprise entre 2 et 10 mg.

Les causes d'erreurs dues au tropanol, aux bases volatiles ou aux dérivés aminés sont donc ici éliminées. A.B. COLBY et J.L. BEAL (29) qui ont comparé les résultats obtenus avec la réaction de VITALI et la précipitation des alcaloïdes à l'état de reineckates concluent que ce dernier dosage se rapproche davantage de la méthode U.S.P. XIV que celui de VITALI, avec une erreur plus faible que dans la méthode officielle. En outre, la coloration est plus stable que celle de VITALI, mais le procédé est moins rapide.

On a aussi utilisé la coloration obtenue par chauffage de l'atropine avec la paradiméthylaminobenzaldéhyde en solution sulfurique (Réactif de WASICKY).

DURICK et ses collaborateurs (40) ont réalisé un dosage colorimétrique à l'aide du pourpre de bromocrésol qui donne un produit d'addition avec tous les alcaloïdes des solanacées. La méthode est applicable aux produits galéniques.

Récemment, a été proposé un dosage basé sur la coloration d'un complexe atropine-SO₄Cu-acide naphtéinique (L. WORRELL et R.E. BOOTH - 145).

++++
++++

PROCEDES PHYSICOCHEMQUES

En 1946, H.F.W. KIRKPATRICK (87) reprenant ses travaux antérieurs sur le dosage polarographique des alcaloïdes, observe que, seul, le bromhydrate d'atropine peut être dosé par cette méthode, les vagues étant dues uniquement à la

concentration de brome. Il faut donc que l'identité et la pureté de l'alcaloïde soient certaines, et cette méthode exige des conditions bien déterminées.

Les sels de base alcaloïdique faible (l'atropine en particulier) sont difficilement titrables en solution aqueuse. Le point final du titrage est plus précis si la solution contient 50 à 75 pour cent d'alcool éthylique ou mieux de propanol. Mais tous les inconvénients disparaissent si on substitue au dosage avec un réactif indicateur, un dosage potentiométrique (L. SAUNDERS et R.S. SRIVASTAVA - 129).

L'application de la méthode potentiométrique au contrôle des médicaments (DOMANGE-38) montre tout l'intérêt de la méthode.

La détermination du pouvoir rotatoire des alcaloïdes isolés des extraits serait une des méthodes les plus spécifiques. A. GORIS et A. LIOT, M.M. JANOT et A. GORIS (64) la préféraient aux méthodes physiologiques, car elle serait moins longue à effectuer. Quelques auteurs ont mis à profit le pouvoir rotatoire de l'hyoscyamine pour connaître la composition d'un mélange d'alcaloïde, mais il faut isoler la scopolamine qui fausserait les résultats (126)

La spectrophotométrie d'absorption de l'acide tropique ou des alcaloïdes a été également utilisée (A. BERGREEN, M. NORDBERG - 15).

++++
++++

TITRATION PAR ESSAI BIOLOGIQUE

Voici les différentes techniques qui ont été proposées :

J. LEVY (95 bis) indiquait en 1929 une comparaison entre une solution étalon et la solution à doser par mydriase sur l'oeil énucléé de grenouille.

En 1932, PULEWSKA (117) comparait la dilatation de la pupille de la souris sous l'effet de l'échantillon à doser et de

concentrations connues de sulfate d'atropine. Il a repris ses travaux en 1935 (118) et G.M. WATSON, C.R.C. HEARD et W.O. JAMES (143) les ont complétés en 1941.

En 1948, H. TØNNESEN (135) étudie à nouveau la méthode de PULEWSKA et applique ce procédé à la recherche toxicologique.

CUSHNY (31) utilise la propriété que possède la belladone d'arrêter les sécrétions salivaires, antagoniste en cela de la pilocarpine.

J. LEVY et E. MICHEL (98) ont proposé en 1938 de déterminer la proportion d'hyoscyamine et d'atropine dans les préparations de belladone par action de ces alcaloïdes sur le duodénum isolé du rat. J. LEVY (97) décrit ainsi sa méthode en 1945 :

La méthode consiste à déterminer, d'une part la quantité d'atropine capable de réduire de 50 pour cent la contraction provoquée par une solution fraîchement préparée de chlorhydrate d'acétylcholine ajoutée au bain dans lequel est immergé le duodénum de rat, et, d'autre part, la dose de l'alcaloïde à comparer capable de provoquer une action analogue.

On peut utiliser également un sel d'hyoscyamine comme étalon.

Les extraits sont traités suivant la méthode du Codex pour l'extraction des alcaloïdes totaux. Le dosage biologique est effectué sur le duodénum du rat après extraction des alcaloïdes. Après racémisation des alcaloïdes, par contact pendant 2 h $\frac{1}{2}$ avec une solution de soude 0,01 N, à la température de + 20°, un nouveau dosage biologique est effectué. On en déduit la quantité d'hyoscyamine qui a été racémisée - donc la quantité d'hyoscyamine préexistante - car d'après J. LEVY l'hyoscyamine, après racémisation, serait deux fois moins active physiologiquement.

Il nous semble utile de rappeler que les résultats obtenus par l'auteur (97) prouvent que, dans la poudre de belladone et les teintures, l'alcaloïde se trouve presque entièrement à l'état d'hyoscyamine. Dans les extraits n'ayant subi qu'une action modérée de la chaleur, l'alcaloïde est en grande partie à l'état d'hyoscyamine, mais, pour des extraits trop chauffés ou conservés depuis longtemps, cet alcaloïde est en plus ou moins grande partie transformé en atropine.

+++++

+++++

CONCLUSIONS

+++++

Après avoir examiné les principales méthodes de dosage de alcaloïdes des solanacées, nous pouvons, en toute connaissance, essayer de répondre à la question suivante : comment se pose le problème du dosage des alcaloïdes des solanacées ?

Il peut être envisagé sous deux points de vue :

En premier lieu, les difficultés techniques, qui sont dues à la présence de chlorophylle et à la présence de bases volatiles

- Dans le procédé du Codex, la chlorophylle de la poudre ou de la teinture est extraite en même temps que les alcaloïdes et colore la solution à titrer d'une belle teinte verte, qui rend assez difficile le titrage final.

J. LEVY (97) signalait en 1945 que

"le dosage volumétrique de l'acide sulfurique en excès par une solution alcaline, en présence d'iodéosine, est assez délicat et devient extrêmement imprécis si les solutions se colorent même légèrement, ce qui est de règle dans le dosage des teintures où le dosage à l'iodéosine est pratiquement impossible".

De plus, les essais pratiqués en agitant une solution d'acide avec du chloroforme, puis en titrant l'acide avec une base, montrent qu'il y a une certaine perte d'acide (voir p.114)

Dans la pharmacopée helvétique, l'extrait et la teinture de belladone sont exempts de chlorophylle.

- Présence de bases volatiles: nous avons vu comment on a réussi, plus ou moins parfaitement, à éliminer ces substances gênantes avant de faire le dosage final acidimétrique des alcaloïdes (évaporations poussées jusqu'à disparition d'odeur du solvant, jusqu'à poids constant ...)

Il faut en second lieu résoudre cette question : Faut-il doser les alcaloïdes totaux ou l'hyoscyamine seule ?

J. LEVY (96) constate que l'hyoscyamine se trouve le plus

souvent, après extraction, en présence d'atropine par suite d'une racémisation due à la chaleur ou aux alcalis. Elle écrit:

" Il s'ensuit que les préparations galéniques de belladone peuvent contenir, en quantités variables, suivant leur mode de préparation, des mélanges d'atropine et d'hyoscyamine... Or le coefficient thérapeutique de l'hyoscyamine est trois fois plus faible que celui de l'atropine. Aussi n'est-il pas indifférent de connaître les taux respectifs des différentes préparations galéniques de belladone en ces deux alcaloïdes. Cette différenciation ne peut avoir lieu qu'à la suite d'un dosage biologique."

Donc un dosage chimique ne suffit pas et " il faudrait pouvoir compléter le dosage par la lecture du pouvoir rotatoire des alcaloïdes existants dans l'extrait " (64), c'est ce qu'ont réalisé en particulier SCHILL et ÅGREN.

Il n'est pas douteux d'autre part que les méthodes chimiques et les méthodes biologiques peuvent ne pas concorder (108) et (143). Mais la racémisation semble n'avoir lieu que par suite de la conservation des préparations ou de leur obtention dans de mauvaises conditions (56).

Comment alors réaliser le dosage de chaque alcaloïde ?

L'activité de l'hyoscyamine étant double de celle de l'atropine, un premier dosage physiologique donne l'activité totale des alcaloïdes, puis un second dosage après racémisation de l'hyoscyamine donne l'activité de ces alcaloïdes entièrement sous forme d'atropine. Il est facile d'en déduire la quantité d'hyoscyamine existante lors du premier dosage (J. LEVY).

Mais un dosage biologique est délicat, et ne peut être à la portée de tous. De plus, il ne nous semble pas tenir compte de la scopolamine présente dans toutes les solanacées comme nous le verrons bientôt. Enfin, la précision n'excède pas 10 à 25 pour cent. (97)

La séparation chimique fait appel soit à des éluations soit à des extractions fractionnées à des pH différents (W.C. EVANS, M.W. PARTRIDGE - J.M. ROWSON) et exige des adsorbants spéciaux. En outre, pour connaître la quantité de chacun des

alcaloïdes, il faut y adjoindre nécessairement une lecture polarimétrique.

On sait que la scopolamine a un pouvoir rotatoire spécifique lévogyre de -18° et l'hyoscyamine de -22° . Il faut donc tenir compte de la présence de scopolamine lors du calcul du taux de l'hyoscyamine, ce qui ne peut avoir lieu que si on peut isoler la scopolamine. Dans la discussion de l'article de J.M. ROWSON, le Dr. G.E. FOSTER (127 bis) note même que les alcaloïdes extraits comme hyoscine ne contiennent pas seulement la (1)hyoscine (ou scopolamine), mais aussi une hyoscine de pouvoir rotatoire plus faible. Il faut donc séparer l'hyoscyamine-atropine de la scopolamine, sinon la lecture polarimétrique est faussée.

Nous pensons que si, théoriquement, le dosage de l'hyoscyamine seule, plus active, semble préférable au dosage d'alcaloïdes totaux, les dosages physicochimiques paraissent actuellement pouvoir suffire à déterminer la valeur thérapeutique d'une drogue ou de ses préparations.

Il nous paraît intéressant de citer ici des analyses de F. GSTIRNER et G. STEIN (67), de J.M. ROWSON (127) et de J.LEVY (97).

Voici quelques résultats de GSTIRNER et STEIN

Plante étudiée	Alcaloïdes pour cent		
	Hyoscyamine	Atropine	Scopolamine
Belladone : racines	0,324	0,031	0,005
Jusquiame : feuilles	0,117	0,000	0,002
Stramoine : feuilles	0,257	0,005	0,003

Nous avons groupé sur un même tableau quelques uns des résultats de ROWSON .

Plante étudiée	Alcaloïdes totaux pour cent	Pourcentage d'alcaloïdes		
		Hyosc.	Atrop.	Scopol.
<u>Datura</u> :feuille séchée	0,2751	81,6	6	12,4
à 55°	0,2541	84	3,9	12,1
	0,2552	70,8	12,9	16,3
à 35°	0,3016	49,6	31,5	18,9
<u>Datura</u> :feuille conser-	0,2762	75,7	8,5	15,8
vée 6 mois après sé-	0,2793	85,9	3,1	11
chage rapide à 55°				
<u>Belladone</u> :feuille sé-	0,7011	83,4	10,1	6,5
chée 6 h à 100°	0,6942	80,7	12,4	6,9
	0,3457	69	20,5	10,5
<u>Belladone</u> :feuille con-	0,1949	82,1	7,0	10,9
servée 6 mois après	0,2477	57	34,6	8,4
séchage rapide à 55°	0,2374	50	39,9	9,3
<u>Jusquiame</u> :feuille sé-	0,0478	43,5	22,9	33,6
chée 6 h à 100°	0,0638	76,3	3,7	20
	0,1220	65	7,4	27,6

Le pourcentage d'atropine semble assez faible dans la majorité des cas. Les deux résultats de 34,6 et 39,9 pour cent d'atropine dans la poudre de belladone conservée 6 mois ne nous semblent pas une condition suffisante pour justifier un dosage qui aurait lieu, par le fabricant, après le séchage. La limite d'utilisation seule est en cause. D'autre part, le chiffre de 20,5 d'atropine pour la belladone correspond à une poudre séchée à 100°. J.M. ROWSON insiste sur l'influence de la température de séchage sur la racémisation, et note que la température optimum est de 55° (une température de 35° - voisine du Codex français qui indique 40° - provoque une assez forte racémisation si la durée de séchage doit être augmentée).

Signalons en passant que pour J.M. ROWSON la proportion de scopolamine est une constante pour une espèce donnée, 8,7 pour la feuille de belladone, 27,1 pour celle d'*Hyoscyamus Niger* et 12,7 pour celle de *Datura*.

Dans la discussion qui a suivi la publication des travaux de EVANS et PARTRIDGE en 1952, le Dr. MITCHELL a même proposé de standardiser le dosage sur le titre en scopolamine seule. Il est encore trop tôt croyons-nous, pour songer à une telle standardisation.

D'ailleurs, on a signalé des variations importantes dans les proportions relatives de scopolamine et d'hyoscyamine dans les espèces - J.M. ROWSON (127), EVANS et PARTRIDGE (49), BARNARD et FINNEMORE (12), HILLS et ses Collaborateurs (74) et HEGNAUER (70) - et il ne semble pas que cette question soit résolue dans un proche avenir.

Voici les résultats obtenus par J. LEVY dans l'analyse des extraits de belladone (97) :

"Dans les deux extraits Dausse examinés, aussi bien dans le plus récent que dans le plus ancien, il n'y a pas d'atropine ou seulement de faibles quantités ...

L'intrait conservé sans précaution particulière se racémise à la longue, tandis que fraîchement préparé il ne contient que de l'hyoscyamine...

Les différentes teintures examinées contiennent comme unique principe actif, de l'hyoscyamine...

Lorsque les poudres de belladone sont conservées dans certaines conditions, elles ne contiennent que de l'hyoscyamine. Par contre, conservées sans précaution, ces poudres ne contiennent plus à la longue que de l'atropine."

Nous pouvons conclure de ces résultats que le dosage de chacun des alcaloïdes des solanacées est possible. Mais est-il pratiquement réalisable ? Qu'il s'agisse de dosage biologique ou de dosage physicochimique, le temps nécessaire à leur exécution, leur réalisation délicate en rendraient les résultats bien illusoire s'ils étaient pratiqués en dehors des laboratoires de recherches.

De plus, une préparation sérieuse, telle qu'elle est pratiquée par les laboratoires galéniques spécialisés, est une garantie en général suffisante de l'activité des produits obtenus puisque toutes précautions ont été prises pour éviter la racémisation de l'hyoscyamine. Il nous paraît donc qu'à l'heure

actuelle un dosage des alcaloïdes totaux est suffisant à défaut d'une séparation adaptée à un usage courant.

Nous nous sommes donc contenté de chercher la méthode la plus convenable à un dosage rapide et simple des alcaloïdes des solanacées.

C H A P I T R E III

-:-:-

TRAVAUX PERSONNELS

Nous avons voulu, comme pour la noix vomique, utiliser une méthode qui, alliant la précision à la simplicité et à la rapidité, permette au fabricant comme au pharmacien d'officine une vérification aisée des produits obtenus à partir des solanacées mydriatiques du Codex.

Nous nous sommes inspiré, ici aussi, de la méthode de GRAF (voir p. 35) . L'auteur note que, pour les feuilles fortement chargées en chlorophylle, telles que celles des solanacées lors de l'emploi de la potasse pour l'alcalinisation, les éluats sont d'un jaune pur et privés de la chlorophylle "a" et "b", mais que les alcaloïdes sont détruits en partie. Des bases plus faibles ne causent aucun mal aux bases alcaloïdiques, mais alors les solutions à titrer obtenues sont trop vertes pour permettre une détermination exacte du point final. Le phosphate trisodique offre une alcalinité satisfaisante; il ne détruit pas, dans le court temps nécessaire, les alcaloïdes, mais s'il retient la chlorophylle "b" difficilement soluble dans le chloroforme (aussi bien que la chlorophylline), la chlorophylle "a" passe dans l'éluat. Elle est éliminée par un tour de main simple: on distille complètement le chloroforme élué pour chasser les composés ammoniacaux et le résidu est dissous, en s'aidant d'une faible chaleur, dans quelques cm³ d'alcool et additionné d'environ 3 à 5 cm³ d'éther de pétrole. Par dilution finale lors du titrage final, tout le vert passe dans l'éther de pétrole, et la couche aqueuse sous-jacente se laisse facilement titrer en présence de rouge de méthyle.

Nous avons essayé cette modification, mais le titrage final est alors très difficile, pour ne pas dire impossible. En effet, il se forme une émulsion à la séparation de la couche éther de pétrole - eau alcoolisée qui gêne fortement, et toute la chlorophylle ne passe pas dans l'éther de pétrole, il en reste un peu dans l'eau-alcool. En outre, ce qui est plus grave, une partie des alcaloïdes peut passer dans la couche éther de pétrole, ce qui fausse alors le résultat.

Le procédé indiqué par E. GRAF n'ayant pas permis, entre nos mains, un dosage facile et exact, nous avons cherché s'il serait possible d'éliminer la chlorophylle gênante avant le dosage, sans enlever en même temps des alcaloïdes.

Nous avons essayé d'enlever la chlorophylle, après évaporation de la teinture, par agitation avec du chloroforme sans alcalinisation. Mais le chloroforme extrait en même temps une partie des alcaloïdes, et il y a en outre une perte dans l'ampoule à décantation sur le résidu aqueux qu'on ne peut entièrement récupérer.

Nous avons alors tenté de terminer le dosage par un procédé spécial: après évaporation (pour chasser les alcaloïdes volatils) le résidu alcaloïdique est repris par un excès connu d'acide titré, agité avec du chloroforme pour enlever la chlorophylle, puis l'excès d'acide est titré par la soude.

Nous avons également pensé pouvoir reprendre le résidu par le chloroforme, l'agiter avec une quantité connue en excès d'acide titré, et doser l'excès d'acide, après séparation, par la soude.

Mais dans les deux cas, le chloroforme retient une faible quantité d'acide qui fausse les résultats. Nous avons fait quelques essais avec du chloroforme pur neutre et des solutions titrées d'acide sulfurique 0,01 N et de soude 0,01 N .

80 cm³ ou 40 cm³ de chloroforme agités avec de l'eau distillée neutre, ne lui communiquent aucune réaction acide ou alcaline.

10 cm³ d'acide 0,01 N (correspondant à 10,2 de soude environ 0,01 N) sont agités avec 20 cm³ de chloroforme, puis séparés. Le chloroforme est lavé deux fois avec 10 cm³ d'eau chaque fois. On titre acide et eaux de lavage : il ne faut plus que 10 cm³ de soude.

Le même essai avec cette fois 40 cm³ de chloroforme nous a donné le chiffre de 9,8 cm³ de soude. Il faut alors admettre une perte de 0,1 cm³ environ d'acide 0,01 N pour 10 cm³ de chloroforme. On pourrait réduire ce déficit en utilisant un acide plus fort - 0,1 N par exemple - mais il faudrait alors trop d'alcaloïdes puisque 1 cm³ d'acide centinormal correspond à 2,894 mg d'atropine base.

Ce sont ces essais - renouvelés plusieurs fois avec des résultats analogues - qui nous ont fait abandonner cette idée. Pour la même raison, nous pensons que la titration finale, telle que la décrit le Codex, est susceptible d'être entachée d'une légère erreur.

++++
++++

ESSAIS PRELIMINAIRES

Nous nous sommes alors demandé s'il était vraiment impossible de déplacer l'alcaloïde par la potasse; nous obtiendrions ainsi un éluat pratiquement incolore, si une assez faible quantité de cet alcali ne détruisait pas les alcaloïdes.

M. TØNNESSEN (135) signale qu'en solution aqueuse alcaline, l'hyoscyamine est racémisée en atropine (ce qui ne nous gêne pas pour un dosage total) mais qu'il y a peu d'hydrolyse. J.M. ROWSON (126) indique lui aussi que l'hyoscyamine est stable en solution aqueuse alcaline (pH 10).

Nous avons alors cherché quel était le temps de contact maximum qui, pour une quantité donnée de potasse, permettait une élution quantitative d'atropine, à partir de sulfate d'atropine, sans destruction de celui-ci.

Il nous fallait auparavant vérifier que l'éther permettrait une élution quantitative. Nous préférons en effet ce solvant au chloroforme ou à des mélanges éthéro-chloroformiques en raison de sa facilité d'emploi. Nous avons utilisé le déplacement par une solution de phosphate trisodique à 40 pour cent, préparée, selon les indications de E. GRAF, en dissolvant 36 g de potasse disodique dans 100 cm³ d'eau distillée. Cette solution recristallise à froid, et doit donc être légèrement réchauffée avant usage.

Nous utilisons pour tous ces essais une solution aqueuse de sulfate d'atropine à 1 pour cent. Le dosage final se fait par acidimétrie directe en présence de rouge de méthyle-bleu de méthylène comme indicateur.

1 cm³ d'acide 0,01 N = 3,574 mg de sulfate d'atropine.

Le mode opératoire est le suivant :

20 mg de sulfate d'atropine sont triturés dans une capsule avec 2 cm³ environ de solution de phosphate trisodique à 40 pour cent, puis amenés à sec après 1 minute par 15 g d'alumine pour chromatographie PROLABO ajoutés par petites portions. La poudre est versée dans un tube d'Allihn et éluee par 40 cm³ puis par des portions de 20 cm³ d'éther. Chaque éluat est distillé et titré séparément. Voici les résultats obtenus :

Prise d'essai	Quantité de solvant	Acide 0,01 N en cm ³	Atropine en mg dans la P.E.	Atropine pour cent
15 mg	40 cm ³	4 -	14,29	95,17
	60 "	4,10	14,65	97,56
20 mg	40 "	5,20	18,58	92,8
	60 "	5,50	19,65	98,25
	80 "	5,60	20,01	100,05
30 mg	40 "	7,25	25,91	86,28
	60 "	8,10	28,94	96,37
	80 "	8,40	30,02	100 -

Nous voyons ici que le pourcentage d'alcaloïde retrouvé dans les différentes fractions d'éluat dépend de la prise d'essai. Quand nous travaillerons avec les produits galéniques, où la prise d'essai sera de 20 mg maximum, 80 cm³ seront suffisants, soit 100 cm³ avec la marge de sécurité que nous nous imposons (non compris les 10 cm³ nécessaires pour humecter la colonne).

Nous avons alors cherché le temps de contact optimum qui, pour une quantité donnée de potasse à 30 pour cent, n'entraînait pas de destruction de l'alcaloïde.

Voici les résultats obtenus pour des temps de contact de 30 secondes à 5 minutes, pour une prise d'essai de 20 mg d'atropine éluee par 80 cm³ d'éther .

Alcali	Temps de contact	Acide 0,01 N en cm ³	Atropine en mg dans la P.E.
2 cm ³ KOH 30%	30 sec.	5,60	20,01
	1 min.	5,60	20,01
	1 min. 15 sec.	5,50	19,65
	1 min. 30 sec.	5,40	19,29
	2 min.	5,20	18,58
	3 min.	4,50	16,08
2 cm ³ KOH 40%	1 min.	5,30	18,94
	2 min.	5	17,87

Nous avons donc choisi pour nos expériences :

2 cm³ de potasse à 30 pour cent, le temps de contact étant inférieur à 1 minute, soit 45 - 50 secondes environ. Les résultats obtenus sur des solutions pures sont très satisfaisants.

Nous avons alors cherché si, en opérant sur une préparation galénique, ce faible temps de contact permettait d'obtenir un éluat suffisamment décoloré et contenant tous les alcaloïdes.

L'éluat est jaune très clair et parfois pratiquement incolore pour la teinture ou l'extrait, jaune franc pour la poudre.

++++
 ++++ PROCEDE UTILISE

Ayant fait ces essais préliminaires, nous avons adopté le procédé suivant pour déterminer, d'une part le temps de contact optimum avec la potasse, et d'autre part les précautions nécessaires pour chasser toutes les bases volatiles avant le titrage final. Nous avons opéré sur un extrait de belladone, titrant, par la méthode du Codex, 2,45 pour cent en alcaloïdes totaux exprimés en atropine et rapportés à 10 pour cent d'eau. 0,50 g de cet extrait contiennent donc un peu moins de 12,25 mg d'alcaloïdes, la teneur en eau étant de 12 pour cent.

0,50 g d'extrait sont dilués avec 1 à 2 cm³ d'eau, puis on ajoute 1 cm³ de potasse à 60 pour cent (ou 2 cm³ de potasse à 30 pour cent). Après un contact de 45 secondes à 1 minute 30 secondes suivant les cas, on dessèche par 15 g environ d'alumine pour chromatographie PROLABO ajoutée par petites portions. On verse la poudre sèche obtenue dans un tube d'Allihn, au fond duquel se trouve déjà une couche de 1 cm d'alumine, et on élue par 100 à 120 cm³ d'éther, à la vitesse de 1 à 2 gouttes par seconde en s'aidant au besoin d'un léger vide.

L'éluat est évaporé à sec et laissé 2 minutes au bain-marie bouillant.

Il peut être alors repris directement par 5 cm³ d'alcool et 10 cm³ d'eau, et titré par un acide centinormal, ou repris par 10 cm³ d'éther qui sont évaporés à sec, laissé 5 minutes au bain marie bouillant avant le dosage final.

La reprise par l'éther, suivie d'un chauffage de 5 minutes au bain-marie bouillant, a pour but de chasser les alcaloïdes volatils. Une forte odeur désagréable se dégage alors, et il ne reste pratiquement plus d'alcaloïdes volatils, bien que persiste une légère odeur désagréable car pour deux dosages conduits en parallèle, l'un étant repris une fois et l'autre deux fois, l'écart dans le dosage final n'excède pas 0,05 cm³, ce qui correspond à la précision du dosage.

Il semble que les alcaloïdes volatils soient assez facilement éliminés (chauffage de 2 minutes après évaporation de

l'éther, reprise du résidu par l'éther et nouveau chauffage pendant 5 minutes), du fait de la faible quantité de substance mise en oeuvre.

Voici les résultats obtenus par ce procédé avec 1 cm³ de potasse à 60 pour cent :

Temps de contact	résidu non repris		résidu repris par l'éther	
	Acide 0,01 N en cm ³	Alcaloïdes en mg dans la P.E.	Acide 0,01 N en cm ³	Alcaloïdes en mg dans la P.E.
45 sec.	4,20	12,154	3,80	10,997
I min.	4,20	12,154	3,80	10,997
I min.15	4,60	13,312	4,20	12,154
I min.30	4,25	12,299	3,90	11,286

Nous avons vu que pour l'alcaloïde pur un contact de I minute est optimum: il faut augmenter ce temps de contact pour les préparations galéniques. Ici, un temps de I minute 15 secondes donne le maximum d'alcaloïdes.

Il nous semble, d'autre part, que le pourcentage d'alcaloïdes fixes est le même que celui retrouvé généralement par les différents auteurs. CORIS et BEAUSITE (63) trouvent 8 à 15 pour cent de différence, et nous obtenons une différence de 8,7 et 9,9 pour cent. Nous reviendrons un peu plus loin sur la discussion de notre procédé.

++++ APPLICATION AUX PREPARATIONS DE BELLADONE

Nous avons utilisé ce procédé pour les différentes préparations de Solanacées, avec une prise d'essai contenant 10 à 15 mg d'alcaloïde pour les extraits et 4 à 6 mg seulement

pour les poudres et les teintures en raison de leur faible teneur en alcaloïdes.

Pour la poudre de belladone qui titre 0,30 pour cent d'alcaloïdes, la prise d'essai sera de 2 g.

Pour l'extrait de belladone, à 2,50 pour cent, on utilisera 0,50 g d'extrait (soit environ 12,5 mg d'alcaloïdes).

Il faut 20 g de teinture de belladone, qui ne renferme que 0,03 pour cent d'alcaloïdes.

Les résultats en alcaloïdes totaux sont exprimés en atropine (bien que ce soit l'alcaloïde qui soit en quantité la plus faible), pour se conformer au mode d'expression admis par le Codex.

1 cm³ d'acide 0,01 N correspond à 2,894 mg d'alcaloïdes totaux exprimés en atropine, et l'erreur absolue pour un dosage à 0,05 cm³ près sera de 0,1447 mg.

I - EXTRAIT DE BELLADONE

0,50 g d'extrait sont dissous dans 1 à 2 cm³ d'eau puis on ajoute 2 cm³ de potasse à 30 pour cent et on laisse en contact 1 minute 15 secondes exactement en triturant avec un agitateur. On amène alors aussitôt à sec avec 15 g environ d'alumine ajoutée par petites portions et on verse la poudre séchée dans un tube d'Allihn. On élue avec 100 cm³ d'éther à raison de 1 à 2 gouttes par seconde, en s'aidant au besoin d'un léger vide. Après évaporation, le résidu est laissé 2 minutes environ au bain-marie bouillant, repris par 10 cm³ d'éther, et laissé encore au bain-marie bouillant 5 minutes après évaporation de l'éther. Le résidu est alors dissous dans 10 cm³ environ d'alcool à 90°, on ajoute 20 cm³ d'eau distillée et on titre par l'acide sulfurique centinormal en présence de rouge de méthyle-bleu de méthylène.

Les résultats sont rapportés à un extrait à 10 pour cent d'eau. Voici les résultats obtenus avec un extrait titrant 2,45 pour cent en alcaloïdes totaux par le procédé du Codex 1949, et contenant 12 pour cent d'eau.

Prise d'essai	Acide 0,01 N en cm ³	Alcaloïdes en mg dans la P.E.	Titre en g pour cent	Titre corrigé
0,50	4,20	12,154	2,43	2,494
	4,30	12,444	2,48	2,529
	4,20	12,154	2,43	2,494

II - TEINTURE DE BELLADONE

20 g de teinture sont évaporés au bain-marie à basse température - 40 à 50° - jusqu'à réduction à 2 ou 3 cm³ puis traités comme l'extrait .

Voici les résultats obtenus avec une teinture titrant 0,030 par le procédé du Codex .

Prise d'essai	Acide 0,01 N en cm ³	Alcaloïdes en mg dans la P.E.	Titre en g pour cent
20 g	2,2	6,366	0,031
	2,3	6,656	0,033
	2,25	6,511	0,032

III - POUDRE DE BELLADONE

2 g de poudre finement pulvérisée sont triturés avec 6 à 7 cm³ d'eau (pour avoir une consistance de pâte molle) puis avec 2 cm³ de potasse à 30 pour cent durant 1 minute 15 secondes exactement. On amène aussitôt à sec avec 15 g d'alumine et on continue comme pour l'extrait.

Les résultats sont rapportés à la poudre séchée à 100°.

Voici les résultats obtenus avec notre procédé :

Prise d'essai	Acide 0,01 N en cm ³	Alcaloïdes en mg dans la P.E.	Titre en g pour cent
2 g	3,50	10,129	0,506
	3,60	10,418	0,520
	3,50	10,129	0,506

++++
++++

APPLICATION AUX PREPARATIONS DE DATURA

Les prises d'essai pour la poudre et la teinture sont les mêmes que pour la belladone, à savoir 2 g et 20 g.

Les résultats sont exprimés en alcaloïdes totaux calculés en atropine.

I - TEINTURE DE DATURA

20 g de teinture sont évaporés au bain-marie à basse température jusqu'à réduction de 2-3 cm³ puis traités comme l'extrait de belladone.

Voici les résultats obtenus avec une teinture titrant 0,030 par le procédé du Codex.

Prise d'essai	Acide 0,01 N en cm ³	Alcaloïdes en mg dans la P.E.	Titre en g pour cent
20 g	2,2	6,366	0,031
	2,1	6,077	0,030
	2,2	6,366	0,031

II - POUDRE DE DATURA

2 g de poudre finement pulvérisés sont traités comme la poudre de belladone. Les résultats sont rapportés à la poudre séchée à 100°.

Voici les résultats obtenus avec notre procédé :

Prise d'essai	Acide 0,01 N en cm ³	Alcaloïdes en mg dans la P.E.	Titre en g pour cent
2 g	2,0	5,788	0,289
	2,1	6,077	0,303

++++
++++

APPLICATION AUX PREPARATIONS DE JUSQUIAME

Les prises d'essai sont un peu plus élevées que dans les préparations précédentes en raison de la teneur plus faible en alcaloïdes totaux. Il faut utiliser 2 g d'extrait, 30 g de teinture et 3 g de poudre. Les résultats sont donnés en alcaloïdes totaux exprimés en atropine.

I - EXTRAIT DE JUSQUIAME

Les alcaloïdes de 3 g d'extrait sont dosés comme dans l'extrait de belladone. Le résultat est rapporté à un extrait à 10 pour cent d'eau.

Voici les résultats obtenus avec un extrait à 0,70 pour cent en alcaloïdes totaux et contenant 15 pour cent d'eau.

Prise d'essai	Acide 0,01 N en cm ³	Alcaloïdes en mg dans la P.E.	Titre en g pour cent	Titre corrigé
2 g	4,6	13,312	0,665	0,704
	4,6	13,312	0,665	0,704
	4,5	13,023	0,651	0,689

II - TEINTURE DE JUSQUIAME

30 g de teinture à 0,020 pour cent en alcaloïdes totaux (procédé Codex) sont évaporés et traités comme la teinture de belladone.

Prise d'essai	Acide 0,01 N en cm ³	Alcaloïdes en mg dans la P.E.	Titre en g pour cent
30 g	2,1	6,077	0,020
	2,2	6,366	0,021
	2,2	6,366	0,021

III - POUDRE DE JUSQUIAME

La poudre de jusquiame - 3 g - est traitée comme la poudre de belladone. Les résultats sont rapportés à la poudre desséchée.

Voici les résultats obtenus avec notre procédé :

Prise d'essai	Acide 0,01 N en cm ³	Alcaloïdes en mg dans la P.E.	Titre en g pour cent
3 g	2,1	6,077	0,202
	2,2	6,366	0,211

+++++

+++++

+++++

ELIMINATION DES BASES VOLATILES

Si la présence et l'influence de ces corps dans les dosages acidimétriques des alcaloïdes des solanacées ont été signalées depuis longtemps, les procédés utilisés pour les éliminer varient avec les auteurs. Il faut évidemment employer

la chaleur, puisque ce sont des corps volatils, mais à quelle température, combien de temps et dans quelles conditions doit-on opérer, voilà justement le point délicat.

Depuis l'identification de ces corps par A. LARSONNEAU en 1921, les nombreux auteurs qui ont étudié cette question ont adopté chacun un procédé différent.

En 1941, MARKWELL (102) signalait que dans le cas d'Indian Belladonna, qui contient plus d'alcaloïdes volatils que les plantes européennes, il restait encore des traces de ces corps après avoir chauffé le résidu pendant 4 heures. C.E. CORFIELD, E.W. KASSNER et E. COLLINS reprenant en 1943 (30) les travaux antérieurs, étudient l'influence du temps de chauffage sur une perte possible en principes actifs. Dans la méthode de la pharmacopée des Etats-Unis (résidu de la solution chloroformique repris et chauffé trois fois pendant 15 minutes) il n'y a pas de pertes si on continue le chauffage.

La durée du chauffage ne peut donc pas être trop longue; elle risque plutôt de ne pas l'être assez. Les auteurs comparent les différents procédés possibles: chauffage pendant un certain temps (de 15 minutes à 3 heures) ou jusqu'à ce qu'un papier de tournesol humide suspendu au-dessus du résidu pendant 2 minutes ne bleuisse plus, ou jusqu'à poids plus ou moins constant (ce qui nécessite un chauffage à 100° pendant 4 à 6 heures).

On peut diminuer le temps de chauffage en reprenant le résidu par un solvant après quelques minutes de chauffage, et en répétant plusieurs fois cette opération. Les reprises par l'éther enlèvent moins de bases volatiles que celles par le chloroforme, et K. NAEGELI et H. SEELING (108) ont proposé en 1951 de remplacer ce dernier, pour l'extraction finale et les reprises, par du benzol qui dissout moins de bases volatiles.

Dans notre procédé, le traitement de la drogue par la potasse chasse déjà une partie de l'ammoniaque et des bases

volatiles. En effet, une odeur fortement désagréable et ammoniacale se dégage au moment de la trituration avec la potasse. De plus, nous opérons avec de petites quantités seulement de matière première, qui ne peuvent donc renfermer que peu de bases volatiles.

C'est pourquoi, en reprenant le résidu alcaloïdique laissé 2 minutes au bain-marie bouillant, par quelques cm³ d'éther, et en portant à nouveau 5 minutes au bain-marie bouillant après évaporation de ce dernier, nous obtenons des résultats satisfaisants. En effet, si nous reprenons une troisième fois de la même façon, nous ne constatons pas de différence dans le dosage de deux éluats obtenus simultanément.

+++++

+++++

TITRATION FINALE

+++++

Nous avons employé le même procédé que pour les loganiacées : acidimétrie directe en présence de rouge de méthyle-bleu de méthylène. H. BRINDLE, J.E. CARLESS et H.B. WOODHEAD(21) ont indiqué les courbes de titrage de l'atropine et de l'hyoscine, en solution dans l'eau alcoolique, par un acide faible: le pourcentage de base libre est pratiquement nul à partir de pH 6 pour l'atropine, 5 pour l'hyoscine. Le rouge de méthyle, qui vire pour une zone de pH comprise entre 6,4 et 4,2 permet donc un dosage exact de ces bases, et a l'avantage d'être d'un emploi plus facile que l'iodéosine.

Dans le cas de l'éluat des poudres de solanacées, celui-ci étant d'un jaune franc, le virage se fait du vert-tendre au gris-jaune, qui doit être pris comme terme du dosage. Pour les éluats de teintures ou d'extraits, qui sont pratiquement incolores ou jaune-clair, le virage peut être pris au violet comme en solution incolore.

Nous avons pensé utiliser la réaction colorée de VITALI, préconisée par ALLPORT et JONES (4) mais si les colorations

étaient sensiblement proportionnelles aux quantités d'alcaloïdes mis en oeuvre, il se produisait un trouble assez important qui empêchait toute lecture spectrophotométrique. Nous pensons que ce trouble était peut-être dû au fait que nous utilisons de l'acétone non désséché, les faibles quantités d'eau qu'il était susceptible de renfermer précipitant la solution alcoolique de potasse.

+++++

CONCLUSIONS

+++++

Nous avons choisi la méthode de GRAF (65) comme base expérimentale à nos recherches sur le dosage des alcaloïdes de solanacées, puis nous avons adopté une méthode similaire mais s'en distinguant par les points suivants :

L'alcalinisation préalable à l'adsorption sur alumine se fait avec la potasse qui dans un temps de contact bien délimité ne détruit pas les alcaloïdes.

L'emploi de potasse nous permet d'éliminer totalement (ou presque) la chlorophylle si bien que la titration finale des alcaloïdes est aisée, et ne nécessite pas de précaution spéciale.

L'élution des alcaloïdes se fait à l'aide d'éther.

Pour enlever les bases volatiles susceptibles de fausser le dosage nous avons adopté deux évaporations successives de la solution étherée et le maintien du résidu d'évaporation pendant quelques minutes au bain-marie.

La méthode ainsi réalisée est rapide, simple et fidèle.

C O N C L U S I O N S

-:-:-

L'analyse des drogues et préparations galéniques appartenant aux loganiacées et aux solanacées offre beaucoup de difficultés. Les méthodes officielles elles-mêmes, choisies par les pharmacopées des différents pays, sont sans cesse remaniées afin d'y apporter des améliorations.

Devant la complexité de ces problèmes analytiques nous avons jugé nécessaire de faire une mise au point des méthodes les plus employées à l'heure actuelle, méthodes officielles et méthodes chromatographiques. De cet examen, nous retenons les considérations suivantes :

Pour les LOGANIACEES, les pharmacopées ont en général imposé un titre en alcaloïdes totaux, c'est à dire strychnine + brucine. Cependant la pharmacopée française y ajoute le titre en strychnine pour la poudre de noix vomique, et les pharmacopées britannique et américaine ne mentionnent même plus le titre en alcaloïdes totaux, elles indiquent seulement le titre en strychnine.

Nous pensons que seul le titre en strychnine pourrait être désormais exigé, soit 1,20 pour cent pour la poudre de noix vomique, 7,4 pour cent pour l'extrait et 0,115 pour cent pour la teinture (chiffres de la pharmacopée britannique de 1953). Ce titre en strychnine aurait l'avantage de correspondre à l'activité et à la toxicité réelle de la drogue.

Nous n'avons pas trouvé de procédé simple et rapide de dosage de la strychnine en présence de brucine, et qui soit à la portée de chaque pharmacien. Il est nécessaire de détruire la brucine. Cette destruction se fait d'ailleurs facilement par l'acide nitrique.

Nous avons réussi à détruire dans des conditions bien déterminées la brucine directement dans la préparation étudiée sans toucher à la strychnine. La strychnine est ensuite extraite par l'éther après adsorption sur colonne d'alumine.

Notre méthode inspirée de celle de GRAF est la suivante:

0,20 g d'extract (ou 10 g de teinture évaporés au bain-marie jusqu'à réduction à 1 cm³) sont dissous dans 2 cm³ environ d'eau, puis triturés pendant 1 minute 30 à 2 minutes avec 1 cm³ d'acide nitrique dilué au demi.

La solution est ensuite additionnée de 3 cm³ de potasse à 60 pour cent qu'on laisse en contact 1 minute en agitant avec un agitateur (la capsule étant trempée dans de l'eau froide pour éviter un échauffement du produit).

On amène alors aussitôt à sec avec 15 g environ d'alumine pour chromatographie PROLABO ajoutée par petites portions, et on verse la poudre sèche dans un tube d'Allihn (de 10 cm de hauteur et 2 cm de diamètre, avec un fond en verre frité type 2 ou 3) où se trouve déjà une couche de 1 cm d'alumine pure.

On élue avec 120 cm³ d'éther à raison de 1 à 2 gouttes par seconde, en s'aidant au besoin d'un léger vide.

Après évaporation, le résidu est dissous dans 10 cm³ d'alcool à 90°, on ajoute 20 cm³ d'eau distillée et on titre par l'acide sulfurique centinormal en présence de rouge de méthyle-bleu de méthylène.

Pour la poudre, une hydrolyse préalable est nécessaire. Elle se fait, selon le procédé de GRAF, en triturant dans une capsule, 1 g de poudre avec 10 cm³ d'alcool et 20 gouttes d'acide chlorhydrique concentré. On porte au bain-marie jusqu'à évaporation à sec et après refroidissement on traite comme l'extract, en utilisant 2 cm³ d'acide nitrique et 4 cm³ de potasse.

Le dosage des alcaloïdes dans les SOLANACEES présente des difficultés particulières dues à la présence, d'une part de plusieurs alcaloïdes, d'autre part de bases volatiles susceptibles de fausser le dosage acidimétrique des alcaloïdes.

La composition des alcaloïdes des solanacées n'est pas exactement connue; il y a quelques années on considérait encore l'atropine comme le principal alcaloïde. Actuellement il est certain que la (1)hyoscyamine représente la presque totalité des alcaloïdes, l'atropine se trouve en faible quantité dans la drogue (ou en serait même absente) quand celle-ci a été convenablement séchée; l'atropine se trouve en quantité plus importante dans les préparations quand certaines précautions n'ont pas été prises pour empêcher la racémisation de la (1)hyoscyamine.

D'autre part une racémisation se produisant à la longue, il serait souhaitable qu'un délai d'utilisation soit donné pour toutes les préparations de solanacées, y compris la poudre de feuille (Le Codex indique d'ailleurs une conservation limite d'un an pour la teinture de belladone).

Le titre alcaloïdique doit être exprimé non en atropine, mais en hyoscyamine puisque ce dernier est bien l'alcaloïde principal.

La présence de scopolamine dans la belladone semble, à l'heure actuelle, ne faire plus de doute.

L'élimination des bases volatiles a reçu plusieurs solutions satisfaisantes qui consistent dans une dessiccation suffisante du résidu d'évaporation de la solution alcaloïdique avant le titrage final.

Malgré les recherches nombreuses sur la séparation des divers alcaloïdes, les méthodes sont actuellement trop compliquées et trop délicates pour être utilisées en dehors des laboratoires spécialisés. D'ailleurs l'hyoscyamine étant le

principal composant des alcaloïdes, un dosage des alcaloïdes totaux suffit, dans la plupart des cas, à contrôler la valeur thérapeutique d'une préparation.

Nous avons essayé de réaliser pour les solanacées comme pour la noix vomique un dosage simple des alcaloïdes totaux en nous inspirant ici encore de la méthode de GRAF. Mais l'alcalinisation (préalable à l'adsorption) préconisée par l'auteur conduisait à l'obtention finale d'un éluat chloroformique très coloré par la chlorophylle, se prêtant difficilement à un dosage même en adoptant certains artifices.

Nous avons établi que la potasse - dans des conditions exactement déterminées - ne détruisait pas les alcaloïdes et permettait de faire un dosage acidimétrique correct dans un éluat éthéré pratiquement incolore dans le cas d'extraits et teintures, et jaune franc dans le cas des poudres.

La méthode que nous proposons est la suivante :

L'extract, la teinture évaporée ou la poudre (triturée avec une quantité d'eau suffisante pour avoir une pâte molle), sont additionnés de 2 cm³ de potasse à 30 pour cent qu'on laisse en contact 1 minute 15 secondes exactement.

On continue comme pour la noix vomique, l'élution se faisant avec 100 cm³ d'éther seulement.

Après évaporation, le résidu alcaloïdique est laissé 2 minutes au bain-marie bouillant, repris par quelques cm³ d'éther puis laissé 5 minutes au bain-marie bouillant après évaporation de l'éther. Terminer comme pour la noix vomique.

En résumé, nous avons réalisé deux techniques simples de dosage des alcaloïdes de loganiacées et de solanacées. Notre méthode, appliquée aux préparations galéniques inscrites à la pharmacopée française de 1949, nous a donné des résultats satisfaisants.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ADAMS, HOLMES
J.Soc.Chem.Ind. 1935,54,17 d'après (80)
- 2 - J.ALLEN, N.L.ALLPORT
The Colorimetric determination of strychnine in Nux Vomica and its preparations.
Quart.J.Pharm.Pharmacol. 1940,13,252.
- 3 - N.L. ALLPORT
Colorimetric Analysis. London 1951, Chapman et Hall L.T.D., 3ème Ed.
- 4 - H.L. ALLPORT, N.R. JONES
Colorimetric data for the assay of certain alkaloidal hypodermic tablets and injections.
Quart.J.Pharm.Pharmacol. 1942,15,238.
- 5 - N.L. ALLPORT, E.S. WILSON
A rapid colorimetric assay of Belladonna and Stramonium.
Quart.J.Pharm.Pharmacol.1939,12,399 .
- 6 - ANDERSEN
Farm. Tid. Kbh. 1943,53,697, d'après (119).
- 7 - C. ANTONIANI
Giorn.Ch. Ind. 1934,16,9, d'après (94).
- 8 - APPLEZWEIG
J.Am.Chem.Soc. 1944,66,1990, d'après (18).
- 9 - M.G. ASHLEY
An application of the Vitali-Morin reaction to the determination of small quantities of hyoscyne hydrobromide in some pharmaceutical preparations.
J.Pharm.Pharmacol. 1952,4,181.
- 10 - H. BAGGESGAARD, D. FUCHS, L. LUNDBERG
The use of ion exchangers in the analysis of salts of weak organic bases and weak organic acid.
J.Pharm.Pharmacol. 1952,4,566.
- 11 - F.J. BANDELIN
Determination colorimetric of alkaloids.
J.Am.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1950,39,493.
- 12 - BARNARD, FINNEMORE
J. Counc. Sc. Ind. Res. Austr. 1945,18,277,d'après(49)
- 13 - F. BEAUSITE
Etude sur la teneur alcaloïdique de la belladone cultivée. Thèse Pharm. Paris 1919.
- 14 - Ch. BEDEL
Semi-microméthode de dosage de la strychnine.
Ann.Pharm.franc. 1943,1,104

- 15 - A. BERGGREN, M. NORDBERG
The assay of tropa alkaloids.
Farm.Revy 1952, n° 10, 177.
- 16 - R.N. BHATTACHARYA, A.K. GANGULY
The ultra-violet spectrophotometric assay of alkaloids. (I) Strychnine in the presence of brucine.
J.Pharm.Pharmacol. 1952,4,485
- 17 - I. BIGGS
The Spectrophotometric identification and estimation of strychnine, brucine and morphine in viscera extracts.
J.Pharm.Pharmacol. 1952,4,547.
- 18 - C.O. BJÖRLING, A. BERGGREN
The adsorption analysis of tropa alkaloids.
J.Pharm.Pharmacol. 1953,5,169.
- 19 - Al. BLANCHER
Séparation quantitative de la brucine et de la strychnine.
Thèse Pharm.Paris 1903.
- 20 - H. BÖHME, H. LAMPE
Über das Verhalten von Alkaloidsalzlösungen an Aluminiumoxydsäulen.
Arch.der Pharm. 1952,285,175.
- 21 - H. BRINDLE, J.E. CARLESS, H.B. WOODHEAD
The separation of alkaloids by partition paper chromatography. (I) The Solanaceous alkaloid. (II) The water insoluble alkaloids of Ergot.
J.Pharm.Pharmacol. 1951,3,793.
- 22 - BRITISH PHARMACOPOEIA 1953.
- 23 - N.G. BROWN, E.R. KIRCH, G.L. WEBSTER
Assay of solanaceous drugs using an adsorption column.
J.An.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1948,37,24.
- 24 - C.W. BROWNLEE
The assay of alkaloidal galenicals using the Chromatograph.
Pharm.J. 1945,155,61.
- 25 - A. BRUNZELL, T. CANBACK, H. SEYDLITZ
Tropic Acid Derivates, photometric determination of.
Farm.Revy 1947,46,729, in Quart.J.Pharm.Pharmacol. 1948,21,72.
- 26 - W.J. BUTLER, G.A. WIESS
The effect of certain nonionic wetting agents in extraction of alkaloidal drugs.
J.Am.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1953,42,382.
- 27 - M. CHAMBON
Dosage de la strychnine en présence de quinine.
Ann.Pharm.franç. 1946,4,89.

- 28 - R. CHARONNAT, J. ORMANCEY
Nouvelle méthode d'extraction des traces d'alkaloïdes
Ann.Pharm.frang. 1947,5,73.
- 29 - A.B. COLBY, J.L. BEAL
A study on two colorimetric assays for solanaceae
alkaloïds.
J.Am.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1952,41,351.
- 30 - C.E. CORFIELD, E.W. KASSNER, E. COLLINS
Indian Belladonna. Some notes on its alkaloïds
content and on the macroscopical characters and al-
kaloïd content of Plants grown at New Barnet.
Quart.J.Pharm.Pharmacol. 1943,16,108.
- 31 - A.R. CUSHNY
J.Pharm.exp.Therap. 1919,13,71, d'après (96).
- 32 - S.J. DEAN, D.C. BRODIE, E. BROCHMANN-HANSEN, S. RIEGELMAN
The preparation of belladonna and stramonium tinc-
tures through the use of the colloïdal mill.
J.Am.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1953,42,89
- 33 - R. DEBREUILLE
Procédé rapide de dosage limite des alcaloïdes dans
les préparations du Codex.
Thèse Pharm. Paris 1927.
- 34 - P. DEMOEN, P. JANSSEN
Etude spectrophotométrique de la strychnine et de la
brucine.
J.Pharm.Belg. 1952,17,80.
- 35 - G. DENIGES
Théorie et modification rationnelle de la réaction
de Mazaquin pour la caractérisation de la strychnine.
Bull.Soc.Chim. 1911,(1),537.
- 36 - DEUTSCHES ARZNEIBUCH 6 Ausgabe - 1926.
- 37 - S.P. DIJKSTRA
An Improved Hegnaüer and Flück method for the deter-
mination of alkaloïds in solanaceous drugs.
Pharm.Weckbl. 1951,86,129, in J.Pharm.Pharmacol
1951,3,369.
- 38 - L. DOMANGE
L'analyse potentiométrique appliquée au contrôle des
médicaments.
J.Pharm.Pharmacol. 1952,4,513.
- 39 - G. DUJARDIN
Contribution à l'étude du dosage de la strychnine et
de la brucine dans l'extrait de noix vomique.
Thèse Pharm.Paris 1924.

- 40 - Fr. DURICK, J.S. KING, J.P.A. WARE, G. CRONHEIM
A colorimetric method for the estimation of some
tropine alkaloids.
J.Am.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1950,39,680.
- 41 - R. EDER, O. RUCKSTUHL
Über die Bestimmung der Gesamtalkaloide und von
Hyoscyamin in Folium Belladonnae.
Pharm.Acta Helv. 1943,8,605.
- 42 - R. EDER, O. RUCKSTUHL
Über die Bestimmung des Strychnins neben Brucin
und die Bestimmung des Strychnins und der Gesamt-
alkaloide in Semen Strychnii und Faba Ignatii.
Pharm.Acta Helv. 1944,82,23.
- 43 - P. EKEBLAD
The direct estimation of the base contents of alka-
loidal halides.
J.Pharm.Pharmacol. 1952,4,636.
- 44 - M.S. EL RIDI, K. KHALIFA
The chromatographic purification and ultra-violet
spectrophotometric assay of strychnine in galenicals.
J.Pharm.Pharmacol. 1952,4,190.
- 45 - O. ERVENIUS, H. LINDQVIST
Atropine sulphate solution, stability of.
Farm.Revy. 1946,45,577, in Quart. J.Pharm.Pharmacol.
1946,12,573.
- 46 - EVANS, DAVY
J.Am.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1934,23,388, d'après (119)
- 47 - W.C. EVANS, M.W. PARTRIDGE
The partition chromatographic of alkaloids (I)
Solanaceous alkaloids.
Quart.J.Pharm.Pharmacol. 1948,21,126.
- 48 - W.C. EVANS, M.W. PARTRIDGE
The partition chromatographic of alkaloids (II) The
alkaloids of Australian datura ferox and of Indian
Henbane.
J.Pharm.Pharmacol. 1949,1,593.
- 49 - W.C. EVANS, M.W. PARTRIDGE
The partition chromatographic of alkaloids (IV) The
assay of Solanaceous drugs.
J.Pharm.Pharmacol. 1952,4,769.
- 50 - Th. EXLER, J. Van NICKERK
J.Pharm.exp.Therap. 1929,36,411, d'après (96)
- 51 - FARMACOPEA UFFICIALE - Sesta Edizione - 1950.
- 52 - R. FISCHER, E. BUCHEGGER
Die adsorptionsanalytische Bestimmung des Strychnins
neben Brucin in Semen Strychnii
Pharm.Zhalle 1950,89,146.

53 - R. FRANCK

Die chromatographische Adsorption als analytische methode zur qualitativen und quantitativen Untersuchung von Arzneistoffen - Königsberg - 1936 .

54 - R. FRANCK

Chromatographische Adsorptionsanalyse in der Pharmazie -(III): Qualitative Untersuchung einiger Arzneistoffe und Arzneizubereitungen.
Arch.der Pharm. 1937,275,125.

55 - A. FRANCOIS

Dosage colorimétrique de la Strychnine dans les préparations du Codex.
Bull.Soc.Pharm.Bordeaux. 1930,25,158.

56 - L.E. FRYKLÖF

Razemisierung des (1)Hyoszyamins bei der Herstellung des trockenen Belladonnaextraktes.
Pharm.Acta Helv. 1952,27,175.

57 - W.C. FULLER, M.R. GIBSON

The arginase - alkaloid relationship in Datura tatula.
J.Am.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1952,41,263.

58 - M. GADREAU

Contribution à l'étude des ferrocyanhydrates d'alcaloïdes et à leurs applications analytiques.
J.Pharm.Chim. 1927,6,145 et Thèse Pharm.Paris 1927.

59 - J.E. GIEROCK

Trennung des Strychnins vom Brucin.
Arch.der Pharm. 1887,237,158.

60 - H.V. GILLILAND, K.L. KAUFMAN, H. BANG

Solanaceous drugs, assay of.
J.Am.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1943,32,236, in Quart.J.
Pharm.Pharmacol. 1943,16,373.

61 - H.M. GORDIN

Die Quantitative Bestimmung des Strychnins in Gemischen von Strychnin und Brucin.
Arch.der.Pharm. 1902,240,641.

62 - A. GORIS, A. LARSONNEAU

Recherches sur la composition chimique des feuilles de belladone.
Bull.Sc.Pharmacol. 1921,24,499.

63 - A. GORIS, F. BEAUSITE

A propos du dosage de l'extrait de belladone et de l'unification des méthodes d'analyse.
Bull.Sc.Pharmacol. 1919,26,53.

64 - Al. GORIS, A. LIOT et M.M. JANOT, An. GORIS

Pharmacie Galénique - 3ème Edition - Paris - MASSON
1949

- 65 - E. GRAF
Chromatographische Alkaloidbestimmung
Dtsche Apoth. Wtg. 1951 n° 43, 797.
- 66 - GRIESBACH
Angew.Chem. 1939,52,215, d'après (80)
- 67 - F. GSTIRNER, G. STEIN
Über die Alkaloidbestimmung in Solanaceendrogen.
Die Pharmazie 1952,8,362.
- 68 - F.O. GUNDERSEN, R. HEIZ, R. KLEVSTRAND
The quantitative determination of alkaloïdal salts
using the strongly basic anion exchanger dowex 2,
and its application in the assay of tablets.
J.Pharm.Pharmacol. 1953,5,608.
- 69 - HAGER
Handb.der Pharmaz. Praxis (II) Berlin 1927,
d'après (42)
- 70 - R. HEGNAÜER
Ph.Weekbl. 1951,86,321, d'après (49)
- 71 - R. HEGNAÜER, H. FLÜCK
Serienmässige Wirkstoffbestimmung mit kleinen
Drogenmengen.
Pharm.Acta Helv. 1948,23,246.
- 72 - B. HEBERT
Etude sur les préparations officinales des loganiacées.
Thèse Pharm.Paris,1903.
- 73 - R.L. HERD
Determination of quinine and strychnine.
J.Am.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1942,31,9.
- 74 - HILLS, TRAUTNER, RODWELL
J.Council Sci. Ind.Res.Austr. 1945,18,234, et
1946,19,295, d'après (49)
- 75 - G.M. HORN, K.L. KAUFMAN, S.G. MITTELSTAEDT
A Study of the assay of strychnine in tincture of
Nux Vomica.
J. Am.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1940,29,183.
- 76 - W.O. JAMES, M. ROBERTS
Nature and specificity of the Vitali-Morin reaction
for Solanaceous alkaloids.
Quart.J.Pharm.Pharmacol. 1945,18,29.
- 77 - K.B. JENSEN, A.B. SVENDSEN
Verteilungschromatographische Trennung und quantita-
tive Bestimmung von Strychnin und Brucin.
Pharm.Acta Helv. 1950,25,31.
- 78 - K. JENTESCH
Spectrophotometrische Unterschreidung von Tinctura
Strychnii und Tinctura Ignatii.
Scientia pharm. 1951,19,219.

79 - K. JENTZSCH

Papierchromatographische Trennung von Solanaceen-alkaloïden (Trennung von atropin bzw hyoscyamine, scopolamine, tropine und scopolamine)
Scientia Pharm. 1952,20,210.

80 - A. JINDRA

The determination of alkaloïds by exchange of ions.
J. Pharm.Pharmacol. 1949,1,81.

81 - A. JINDRA, J. POHORSKY

The determination of alkaloïds by exchange of ions.
J.Pharm.Pharmacol. 1951,3,247.

82 - E.K. JOHNSON, L.W. RISING

Noninterfering adsorbents in alkaloïdal analysis.
J.Am.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1940,29,269 in Quart J.Pharm.
Pharmacol. 1941,14,74.

83 - K. KACZVINSZKI

Zur Analyse von Extr. Belladonnae D.A.B. 6
Oest.Apot.Ztg 1953,7,105.

84 - C.C. KELLER

Die Bestimmung des Alkaloïdgehaltes von Struchnos-Samen.
Ztsch.für Anal.Chem. 1894,35,491.

85 - E.G. KELLET, D.L.T. CADMAN

Assay of alkaloïdals salts.
J.Pharm.Pharmacol. 1950,2,732.

86 - H.F.W. KIRKPATRICK

A polarographic study of alkaloïds.(IV). Strychnin and Brucin.
Quart.J.Pharm.Pharmacol. 1946,19,127 et 1947,20,87.

87 - H.F.W. KIRKPATRICK

A polarographic study of alkaloïds.(V). Tropa - alkaloïds.
Quart.J.Pharm.Pharmacol. 1946,19,526.

88 - KLAN

J.Am.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1931,20,1163, d'après (119)

89 - I.M. KOLTHOFF

Säure-Basen Indikatoren - Berlin 1932 p. 390,
d'après (77).

90 - M. KOLTHOFF, J. LINGANE

J.Am.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1934,23,302, d'après (43)

91 - KUHN, SCHÄFER

Apoth.Ztg. 1938,53,405 et 424, d'après (126)

92 - L. LACHAISE

Sur les méthodes de dosage des alcaloïdes dans les préparations de strychnées.
Thèse Pharm.Paris,1927.

- 93 - A. LARSONNEAU
Recherches sur les alcaloïdes volatils des feuilles de belladone.
Thèse Pharm. Paris, 1922.
- 94 - P. LEBEAU, G. COURTOIS
Traité de Pharmacie Chimique, 3ème Edition - Paris
Masson 1947, tome IV, p. 3575.
- 95 - E. LEDERER
Progrès récents de la chromatographie-(1) Chimie organique et biologique. Paris, Hermann et Cie, 1949.
- 95 bis - J. LEVY
Essais, dosages et contrôles biologiques des substances médicamenteuses.
Paris - Masson - 1930.
- 96 - J. LEVY
Action pharmacologique et toxicité comparée de l'hyoscyamine et de l'atropine.
Bull.Soc.Chim.Biol. 1945, 27, 425.
- 97 - J. LEVY
Dosage biologique des préparations galéniques de belladone.
Bull.Soc.Chim.Biol. 1945, 27, 431.
- 98 - J. LEVY, E. MICHEL
Sur le dosage biologique de faibles quantités d'atropine.
C.R.Soc.Biol. 1933, 127, 12.
- 99 - A. MALER
Contribution à l'étude de la détermination des alcaloïdes dans les extraits secs.
Thèse Pharm. Strasbourg, 1947.
- 100 - P. MALAQUIN
Nouvelle réaction pour la caractérisation de la Strychnine.
J.Pharm.Chim. 1900, 30, 546.
- 101 - MARKWEL
Pharm.J. 1941, 146, 259, d'après (30)
- 102 - M. MASCRE, H. GENOT-BOULANGER
Remarques sur le titre alcaloïdique des préparations galéniques de la belladone et sur sa détermination.
Ann.Pharm.franç. 1946, 4, 145
- 103 - F. MAYER, M. HALAWA
Wien, Klin. Wochschr. 1939, 52, 495, d'après (78)

- 104 - K.W. MARZ, R. FRANCK
Chromatographische Adsorptionsanalyse in der Pharmazie. (IV) Quantitative Untersuchung einiger alkaloidhaltiger Arzneizubereitungen.
Arch.der Pharm. 1937,275,345.
- 105 - A. MOREL
Titre et posologie de l'extrait de jusquiame et de l'extrait de belladone du Codex 1937.
Ann.Pharm.franç. 1946,4,254.
- 106 - Ch. MORIN
La réaction de Vitali-Morin. Nouvelle technique permettant une micro-estimation des corps donnant cette réaction.
J.Pharm.Chim. 1936,23,545.
- 107 - R. MUNIER, M. MACHEBOEUF
Partition chromatographique des alcaloïdes .
Bull.Soc.Chim.Biol. 1949,31,1144.
- 108 - K. NAEGLI, H. SEELING
Die Bestimmung der Solanaceenalkaloïde.
Die Pharmazie 1951,6,217.
- 109 - THE NATIONAL FORMULARY, Eight edition, Published by the American Pharmaceutical Association. 1946. et premier supplément 1947.
- 110 - H. ÖHELOM
Belladonna Stramonium and Hyoscyamus: Assay of.
Farm.Notisbl. 1940,42,191 in Quart J.Pharm.
Pharmacol. 1941,14,188.
- 111 - PADILLA VICIOSO
Galenica Acta, 1950, 11,61, d'après (38)
- 112 - W. PARTRIDGE
Chromatography and its applications in Pharmacy.
J.Pharm.Pharmacol. 1952,4,217.
- 113 - PHARMACOPEE BELGE
4ème Ed. 1930 et Ier sup. 1940.
- 114 - PHARMACOPEIA of the United States of America.
U.S.P. XIV et Ier supplément.
- 115 - PHARMACOPOEA HELVETICA
Editio Quinta, cum supplemento primo, 1949
(Edition française).
- 116 - PHARMACOPOEA INTERNATIONALIS 1951.
- 117 - PULEWSKA
Arch.exp.Path.Pharm. 1932,168,307, d'après (143).
- 118 - PULEWSKA
Arch.exp.Path.Pharm. 1935,178,439, d'après (96).

119 - F. REIMERS

The determination of alkaloid in solanaceous drugs and preparations.

Quart.J.Pharm.Pharmacol. 1948,21,470.

120 - F. REIMERS, K.P. GOTTLIEB, V.Aa CHRISTENSEN

On the chromatographic analysis of alkaloidal salts and on aluminium oxide for quantitative chromatographic analysis.

Quart.J.Pharm.Pharmacol. 1947,20,22.

121 - L. REVOL, G. NOUVEL

Etude critique du dosage des alcaloïdes totaux dans l'extrait de noix vomique (Codex 1937-1949).

Ann.Pharm.franç. 1952,10,108.

122 - L. REVOL, G. NOUVEL

Remarques sur le dosage des alcaloïdes dans l'extrait de noix vomique.

Lyon Pharm. 1951, p.249 et 317.

123 - M. ROBERTS, W.O. JAMES

A method for the estimation of total alkaloids in Belladonna and Stramonium.

Quart.J.Pharm.Pharmacol. 1947,20,1.

124 - S. ROLIAND-LECLERCQ

Le dosage colorimétrique de la strychnine.

J.Pharm.Belg. 1947,12,283.

125 - A. ROEIKE

Photometric Determination of atropine.

Pharm.Zhalle 1952,91,30, in J.Pharm.Pharmacol. 1952,4,1001.

126 - J.M. ROWSON

The determination of hyoscyne, hyoscyamine and atropine.

Quart.J.Pharm.Pharmacol. 1944,17,226.

127 - J.M. ROWSON

The assay of Belladonna and of some other solanaceous drugs. Determination of hyoscyamine, atropine and hyoscyne.

Quart.J.Pharm.Pharmacol. 1944,17,234.

127 bis - J.M. ROWSON

Discussion de l'article précédent.

Quart.J.Pharm.Pharmacol. 1944,17,267.

128 - M. RUBIN, L.D. HARRIS

Stramonium: assay and comparative method of drying

J.Am.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1950,39,477.

129 - L. SAUNDERS, R.S. SRIVASTAVA

The potentiometric titration of alkaloidal salts

J.PharmPharmacol. 1951,3,78.

- 130 - L. SAUNDERS, R.S. SRIVASTAVA
The absorption of some organic bases by carboxylic acid ion-exchange resins (I) Equilibrium studies. J.Chem.Soc. 1952,2111.
- 131 - G. SCHILL, A. ÅGREN
Värdebestämning av belladonnapreparat. Svensk.Farm.Tidskr. 1951,55,797 (et 781 et 825)
- 132 - G. SCHILL, A. ÅGREN
Separation of hyosciamine and hyosцина. Svensk.Farm.Tidskr. 1952,56,55, in J.Pharm.Pharmacol. 1952,4,409.
- 133 - B. SINGH, S.H. ZAHEER
Extraction des alcaloïdes de la noix vomique. Indian J.Pharm. 1953,15,6, in Prod.Pharm. 1953,8,415.
- 134 - M. TØNNESSEN
Thèse Copenhagen 1947, d'après (119)
- 135 - M. TØNNESSEN
Determination of small concentrations of Atropine. Acta Pharm.Toxic. 1948,4,186, in J.Pharm.Pharmacol. 1949,1,721.
- 136 - H.I. TOFT
Biological effect of strychnine in Forensic Chemistri. Acta Pharm. 1946,2,156 in Quart J.Pharm.Pharmacol. 1947,20,54.
- 137 - N. TRAUTNER, NEUFIELD et RODWELL
Austr.Chem.Inst.J.Proc. 1948,15,55, d'après (49)
- 138 - N. TRAUTNER, M. ROBERTS
Separation of Hyoscine and hyosciamine, and the alkaloidal assay of Duboisia spp. Analyst 1948,73,140.
- 139 - H. VALENTIN
Chromatographische Adsorptionsanalyse in der Pharmazie. (I) Pharmaz.Ztg. 1935,36,469.
- 140 - H. VALENTIN, R. FRANCK
Chromatographische Adsorptionsanalyse in der Pharmazie. (II) Pharmaz.Ztg. 1936,37,943.
- 141 - D. VAN OS
The assay of Alkaloidal Salts. J.Pharm.Pharmacol. 1949,1,55.

142 - D. VAN OS

Aluminium oxide for quantitative Chromatographic analysis.

J.Pharm.Pharmacol. 1949,1,350.

143 - G.M. WATSON, C.R.C. HEARD, W.O. JAMES

A comparison of the biological and chemical assays of belladonna and stramonium.

Quart.J.Pharm.Pharmacol. 1941,14,253.

144 - J.A. WITT, V. JIRAWONGSE, H.W. YOUNGKEN

The application of a citric acid buffer in the extraction of Solanaceous alkaloids.

J.Am.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1953,42,63.

145 - L. WORRELL R.E. BOOTH

A spectrophotometric method of assay for Belladonna alkaloids.

J.Am.Pharm.Assoc.Sc.ed. 1953,42,360.

146 - L. ZECHMEISTER

History, scope, and methods of chromatography.

Ann.N.Y.Acad.Sci. 1948,49,145.

- TABLE DES MATIERES -

Avant-Propos

Plan Page 3

Introduction Page 6

PREMIERE PARTIE : LOGANIACEES Page 13

CHAPITRE I : Loganiacées officinales -

Méthodes officielles de dosage..... Page 14

A - Loganiacées inscrites au Codex 1949..... Page 14

B - Préparations officinales..... Page 16

C - Procédés de dosage des pharmacopées française
et étrangères Page 19

CHAPITRE II : Méthodes non officielles de dosage..... Page 33

A - Extraction et purification des alcaloïdes..... Page 33

B - Procédés de séparation strychnine-brucine..... Page 36

C - Titration des alcaloïdes..... Page 42

CHAPITRE III: Travaux personnels Page 47

A - Extraction et purification des alcaloïdes..... Page 49

B - Séparation strychnine-brucine..... Page 61

C - Titration finale..... Page 69

D - Conclusions Page 71

DEUXIEME PARTIE : SOLANACEES Page 72

CHAPITRE I : Solanacées officinales -

Méthodes officielles de dosage..... Page 73

A - Solanacées inscrites au Codex 1949..... Page 73

B - Préparations officinales..... Page 77

C - Procédés de dosage des pharmacopées française
et étrangères Page 80

CHAPITRE II : Méthodes non officielles de dosage..... Page 93

A - Extraction et purification des alcaloïdes..... Page 93

B - Procédés de séparation hyoscyanine-scopolamine..... Page 98

C - Titration des alcaloïdes Page 101

D - Conclusions..... Page 107

CHAPITRE III: Travaux personnels Page 113

A - Extraction et purification des alcaloïdes..... Page 113

B - Elimination des bases volatiles..... Page 124

C - Titration finale..... Page 126

D - Conclusions Page 127

Conclusions..... Page 128

Index Bibliographique Alphabétique..... Page 132

Table des matières

Vu

NANCY, le 19 Octobre 1953

Le Président de Thèse :

A. MEUNIER.

Vu et Approuvé

NANCY, le 19 Octobre 1953

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie

G. RICHARD.

Vu et permis d'Imprimer

NANCY, le 20 Octobre 1953

Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université :

J. CAPELLE.

